Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

MAKRO-KREATINKINASE: Untersuchungen über die Natur von Kreatinkinase-Immunglobulin-Komplexen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Michael Müller
aus Karlsruhe

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0055

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

MAKRO-KREATINKINASE: Untersuchungen über die Natur von Kreatinkinase-Immunglobulin-Komplexen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Michael Müller
aus Karlsruhe

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Harzmann

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meinen Eltern

DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.M. Eggstein, Ordinarius der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Dr.J. Bohner und Herrn Dr.Dr.W. Stein für die vorbildliche Betreuung.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	3
II	METHODE	
	1 Untersuchungsmaterial	8
	2 Geräte	9
	3 Pufferlösungen	10
	4 Präparation der CK-Isoenzyme	11
	5 Elektrophoretische Trennung der CK-Isoenzyme	11
	6 Elektrophoretische Trennung der Serumproteine	12
	7 Messung der CK-Aktivität	13
	8 Darstellung CK-bindender IgG	14
	9 Aufspaltung CK-bindender IgG	15
	10 Immundiffusion nach Ouchterlony	16
III	ERGEBNISSE	
	1 Präparation CK-bindender Immunglobuline	17
	A) Ausschlußchromatographie	
	B) Affinitätschromatographie	
	2 Proteolytische Spaltung CK-BB-bindender IgG	21
	A) Pepsinspaltung	
	B) Papainspaltung	
	3 Koppelung isolierter Antikörper mit CK-Isoenzymen	25
	4 Sättigungsverhalten isolierter Antikörper (Rud) mit CK-BB	30
	5 Sättigungsverhalten nativer Makro-CK-Seren mit CK-BB	32
	6 Verdrängung komplexgebundener CK-MB durch CK-BB	36
	7 Verdrängung von CK-BB aus Makro-CK-BB-Serum durch CK-MB	38
	8 Charakterisierung der CK-IgG-Bindung:	40
	A) Fällung der IgG-CK-BB-Komplexe durch Staphylococcen-Protein A.	
	B) Makro-CK-Komplexe aus pepsingespaltenem Serum (Rud).	
	C) Makro-CK Komplexe aus pepsingespaltenen IgG (Rud).	

UNIV. LEIDEN BIBL.

D) Makro-CK-Komplexe aus papaingespaltenen IgG (Rud).

Seite

IV DISKUSSION 53

1 Isolierung CK-bindender Immunglobuline
2 Eigenschaften der Makro-Kreatinkinase:
A Bindungskapazitäten nativer Makro-CK-Seren
B Rekombination von Makro-CK aus CK-BB und IgG
C Bindungsverhalten mit homologen CK-Isoenzymen
D Kompetitive Bindung zwischen IgG und CK-Isoenzymen
3 Spezifität der CK-Bindung an IgG (Rud)
A Bindungsverhalten pepsingespaltener IgG (Rud)
B Bindungsverhalten papaingespaltener IgG (Rud)

V ZUSAMMENFASSUNG 62

VI LITERATUR 64

I EINLEITUNG

Die Kreatinkinase (ATP: Kreatin-Phosphotransferase E.C. 2.7.3.2., Abkürzung: CK) stellt ein Schlüsselenzym für die Versorgung des Zellstoffwechsels mit energiereichen Phosphaten dar.
Durch Übertragung einer energiereichen, säureamidgebundenen Phosphatgruppe (Kreatin-Phosphat) transferiert das hauptsächlich im Cytoplasma lokalisierte Enzym in eine ebenfalls energiereiche Säureanhydrit-Bindung des Adenosintriphosphat (ATP).

$$\text{Kreatin-P} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{Kreatin} + \text{ATP}$$

$\Delta G^{o'} = -3{,}0$ kcal mol $^{-1}$ (LEHNINGER, 1975)

$\Delta G^{o'}$ = Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen (25 ^{o}C, pH 7,0, einmolare Konzentration der Reaktionsprodukte).

Durch den negativen Werte von $\Delta G^{o'}$ ist das Gleichgewicht nach rechts auf eine ATP-Bildung ausgerichtet. Somit gehört das Enzym neben der Adenylat-Kinase zum ATP-regenerierenden System.
Für den Zellstoffwechsel bedeutet die Kreatinkinase eine Möglichkeit, einen Pool an energiereichen Phosphaten anzulegen, der direkt und ohne Sauerstoffverbrauch mit dem Primärenergieträger ATP im Gleichgewicht steht. Auf diese Weise kann die Zelle im Bedarfsfall das Intervall bis zum Anlaufen der allosterisch geregelten, ATP-erzeugenden Stoffwechselwege wie Glykolyse und Atmungskettenphosphorylierung überbrücken.
Aus Gründen der Homöostase kann ATP selbst nicht angereichert werden, da der "energy-charge" (LEHNINGER 1975) einer Zelle und damit die ATP-Konzentration relativ konstant gehalten wird.
Die Kreatinkinase kommt im menschlichen Organismus in Form von drei Isoenzymen, der CK-MM (Skelett- und Herzmuskel), CK-MB (Herzmuskel), sowie CK-BB (Gehirn und

glatte Muskulatur) vor (LANG et al 1978), wobei bei identischem Molekulargewicht verschiedene Michaelis-Konstanten beschrieben wurden (MORIN 1976). Die Quartärstruktur des Enzymes besteht aus zwei Untereinheiten (M- oder B-Kette), die ein gemeinsames Molekulargewicht von 80 000 D ergeben (DAWSON et al 1967). Zusätzlich zu diesen cytoplasmatischen Enzymen beschrieben BLUM et al (1978 a + b), sowie JAMES et al (1979) eine mitochondriale CK mit identischem Molekulargewicht.
Im menschlichen Gewebe variiert die CK-Isoenzymverteilung von 96 % CK-MM im Skelettmuskel über 72 % CK-MM und 25 % CK-MB im Myokard bis 15 % CK-MM, 24 % CK-MB und 61 % CK-BB im Uterus (JOCKERS-WRETOU et al 1975). Bei einer Erhöhung der Gesamt-CK-Aktivität im Serum läßt diese organspezifische Verteilung auf das geschädigte Organ schließen (GERHARDT et al 1977, PRELLWITZ et al 1978, HAUX et al 1979), was heute routinemäßig in der Herzinfarktdiagnostik eingesetzt wird.
Die Bestimmung der CK-BB hat derzeit keine Bedeutung in der Diagnostik, da sie - von seltenen Ausnahmen abgesehen - nur in Spuren im Serum nachweisbar ist.
Die Serumnormalwerte für die Gesamt-CK betragen bis zu 70 U/l (optimierte Standardmethode), für CK-MB im Immuninhibitionstest weniger als 10 U/l, für CK-BB etwa 0,5 U/l (JUNG et al 1979).

Die unterschiedliche Zusammensetzung der drei Isoenzyme bewirkt differente elektrophoretische Mobilitäten, die zur Identifizierung der Isoenzyme benutzt werden können. Bei pH 7,0 wandert die CK-MM im elektrischen Feld zur Kathode, CK-MB und stärker noch CK-BB in Richtung Anode.

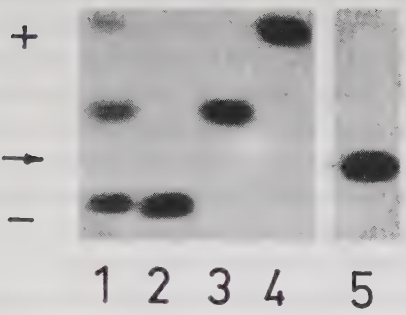


Abb. 1: Agarosegel-Elektrophorese der CK-Isoenzyme und Makro-CK

1 Standard
2 CK-MM
3 CK-MB
4 CK-BB
5 Makro-CK
→ Auftragsstelle

Im Unterschied zu den hier untersuchten Enzym-Immunglobulin-Komplexen findet man auch metastabile CK-Isoenzyme mit normalem Molekulargewicht, die bei erhaltener CK-Aktivität ebenfalls ein verändertes elektrophoretisches Verhalten zeigen.
Derartige metastabile Formen wurden sowohl für die CK-MM (HOMBURGER et al 1980; LEROUX et al 1977), als auch für CK-BB (CHO et al 1976 + 1979; BAYER et al 1972) beschrieben.
Nach Entwicklung des CK-MB-Immuninhibitionstestes (CK-MB, NAC-aktivierter UV-Test, Merck, Darmstadt), traten in der Diagnostik gehäuft Patienten mit einer abnorm erhöhten Serum-"CK-MB" auf, deren Aktivitäten über längere Zeit persistierten (LANG et al 1978, LJUNGDAHL et al 1978).

Da der Test nicht zwischen B-Ketten-Aktivität aus CK-MB und CK-BB unterscheidet, errechneten sich bei Anwesenheit von Serum-CK-BB abnorme, zum Teil über der gemessenen Gesamt-CK liegende CK-MB-Aktivitäten, die dann zu weiteren Untersuchungen führten. Weiterhin fiel das Fehlen eines direkten klinischen Korrelates auf (CHEMNITZ et al 1979), weshalb das Phänomen zunächst als "idiopathische Serum-CK-BB" (LANG et al 1978) bezeichnet wurde.
Unabhängig davon wurden bereits früher "atypische CK-Banden" in der Elektrophorese beschreiben (LIM, 1975; SAX et al 1976). Diese "atypischen Banden" wiesen eine geringe elektrophoretische Mobilität auf und lagen zwischen CK-MM und CK-MB.
BOHNER et al (1979) ordnete diesen atypischen Banden ein Molekulargewicht von 650 000 D und 350 000 D zu, STEIN et al bestimmte (1979) eine Größe von 350 000 D, YUU et al (1978, 1980) gab Werte zwischen 250 000 und 335 000 D an. Weitergehende Untersuchungen von URDAL et al (1979), BOHNER et al (1979) und STEIN et al (1979) wiesen einen als "Makro-CK" bezeichneten Komplex aus IgG und CK-BB nach.
In einem weiteren Fall beschrieb JOCKERS-WRETOU et al (1979) einen Komplex aus IgA und CK-BB.

Wahrscheinlich besteht zwischen der "idiopathischen", persistierenden CK einerseits, der "atypischen CK" (SAX et al 1979) andererseits, sowie mit der hochmolekularen Makro-CK eine Verbindung. Rückblickend dürften diese Erscheinungsformen der Makro-CK zuzuordnen sein.

Entsprechend der langen intravasalen Präsenz zeigte die Makro-CK eine gegenüber dem ungebundenen Isoenzym deutlich erhöhte Stabilität (STEIN et al 1979; BOHNER et al 1981). Die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten für die "idiopathische CK", beziehungsweise Makro-CK, reichen von 5 auf 310 (URDAL et al 1979), 8 auf 800 (LJUNGDAHL et al 1978), 1 auf 1000 (LANG et al 1978) bis 6 auf 2000 (CHEMNITZ et al 1979).

Die Angaben variieren etwas durch das unterschiedliche Selektionsprinzip.

Interessanterweise beschränken sich immunglobulin-gebundene Enzyme nicht nur auf die Kreatinkinase; ähnliche Komplexe sind in den letzten Jahren bei einer Reihe von Enzymen bekannt geworden: Serum-Amylase (KANNO et al 1977; KOBAYASHI et al 1975), Alkalische Serum-Phosphatase (NAGAMINE et al 1975), Laktat-Dehydrogenase (BIEWENGA 1976), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (KAJITA et al 1978) und Aspartat-Amino-Transferase (KONTTINEN et al 1978).

Zielsetzung dieser Arbeit war es, einige Makro-Kreatin-kinasen aus Patientenseren zu isolieren und zur besseren Untersuchung in ihre Komponenten zu zerlegen. Hier-durch erhoffte man sich Aussagen über die Natur dieser CK-Immunglobulin-Komplexe hinsichtlich Bindungsverhalten, Spezifität, Reversibilität und einer eventuellen Kreuz-antigenität mit anderen CK-Isoenzymen.

II METHODE

1.) Untersuchungsmaterial

a) Humangewebe zur Isoenzymisolierung wurde in physiologischer Kochsalzlösung bei -20 °C aufbewahrt.

- CK-MM: Operationsmaterial Skelettmuskel
- CK-MB: Autopsiematerial Myokard (max. 36 Stunden alt)
- CK-BB: Operationsmaterial Uterus

b) Humanseren mit Makro-CK-Komplexen [x]

c) Humanserum zur Kontrolle

x

Pat. Doe., , geb. 1920, 1978 Verdacht auf akuten Myokardinfarkt, CK 204, "CK-MB" 135.

Pat. Rud., , geb. 1907, 1978 Papillitis stenosans, kompletter Rechtsschenkelblock, CK 438, "CK-MB" 521.

Pat. Nau.I Patientendaten standen uns nicht zur Verfügung.

2.) Geräte

Säulen: Sephadex-G-200, 80 x 2,5 cm, Pharmacia, Uppsala
Sephadex-G-100/200/300sf, 59 x 0,9 cm, Pharmacia
Sephadex-DEAE-A-50, 18 x 2,5 cm, LKB,

Protein-A-Sepharose Cl-4B, 4 x 0,9 cm, Pharmacia

Pumpe: LKB 2120 Varioperex^{R} II Pump

Durchflussphotometer zur Bestimmung der UV-Absorption bei 254 nm (LKB Uvicord Type 470 1 A)

Schreiber (LKB 2210 Ein-Channel-Recorder)

Fraktionssammler (LKB 2112 Redi Rac Fraction Collector)

Elektrophoresekammer (LKB Multiphor 2117 mit LKB Power Supply 2103)

Glasplatten (LKB 94 x 84 x 1 mm), Nr. 2117-402

Filterpapier (Whatman, 253 x 104 mm, Grade I), Nr. 2117-203

Eppendorf Photometer Typ M 1101 mit Wechselautomatik und Schreiber

Amicon-Konzentrator Witten, Ruhr

- Mikro-Ultrafiltrationssystem Modell 8 Mc mit Diaflo-Membran, Durchmesser 25 mm, 4 cm^2, Konzentration unter Stickstoffatmosphäre
- Minicon-Einwegkonzentratoren

Typ	Konz.-Fakt.	MG-Grenze
A 25	x 2	25 000
A 75	x 20	75 000
B 15	x 100	15 000
B 125	x 100	125 000

Impulszähler: Frieslke und Hoepfner, Erlangen mit Bohrlochmessonde J^{125}

Homogenisator Potter "30 ml" Fa. B. Braun

Rotationsmesser, IL, X-1020, Fa. Intern. Laborat. App., max. 25 000 Upm.

Sorvall RC 2 Kühlzentrifuge, DuPont

3.) Verwendete Pufferlösungen

Puffer I	pH 7	50 mmol/l Tris
		20 mmol/l NaC
		10 mmol/l NaCl
		10 mmol/l $MgCl_2$
		2 mmol/l EDTA
		3 mmol/l NaN_3
Puffer II	pH 8	50 mmol/l Tris
		100 mmol/l NaCl
		3 mmol/l NaN_3
Puffer III	pH 8	50 mmol/l Tris
		200 mmol/l NaCl
		3 mmol/l NaN_3
Puffer IV	pH 7	50 mmol/l Tris
		500 mmol/l NaCl
		3 mmol/l NaN_3
Puffer V	pH 3	50 mmol/l Glyzin
		20 mmol/l NaCl
		3 mmol/l NaN_3
Puffer VI	pH 7	300 mmol/l Saccharose in Puffer I

4.) Präparation der CK-Isoenzyme

A) Extraktion aus humanem Gewebe:

Die CK-Isoenzyme wurden aus humanem Gewebe extrahiert; CK-MM aus Skelettmuskel, CK-MB aus Myokard und CK-BB aus Uterus.
Aufgrund der Empfindlichkeit der Isoenzyme fand Operationsmaterial Verwendung, lediglich im Falle der CK-MB wurde auf Autopsiematerial zurückgegriffen.
Die Darstellung und Trennung der Isoenzyme erfolgte durch chromatographische Verfahren aus dem Gewebsextrakt.
Die genaue Beschreibung und Ergebnisse bitte ich aus der unveröffentlichten Dissertation von Joachim Krais zu entnehmen.

B) Reinigung radioaktiv markierter CK-BB

Für einen Nachweis Protein-A-gebundener Makro-CK kam ^{125}J markierte CK-BB (DRG, Marburg) zur Verwendung. Um das markierte Enzym von Albumin und anderen Verunreinigungen zu trennen, wurden 5 ml des RIA-Kits auf eine Roche DEAE-A-50-Säule aufgetragen und mit 20 ml Puffer III gewaschen. Die markierte CK-BB löste sich unter Puffer IV vom Ionenaustauscher und wurde in 1-ml-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt und bei 8 ^{o}C eingeengt.

5.) Elektrophoretische Trennung der CK-Isoenzyme

Zur Identifizierung der Isoenzyme diente eine Elektrophoresetechnik mit einem Trägermedium aus frisch gegossenem Agarosegel (1,5 g/dl). Nach einer Elektrophoresedauer von 2,5 Stunden (pH 6,9; 8 ^{o}C) wurden die Isoenzyme spezifisch durch eine enzymatische Färbung (Sigma CPK, Agaro-Stain) dargestellt (vgl. unveröffentlichte Dissertation Joachim Krais).

6.) Elektrophoretische Trennung der Serumproteine

Die Serumelektrophorese erfolgte auf Celluloseacetatfolien (57 x 145 mm, Boskamp) in einer Elektrophoresekammer (Mikrophor, Boskamp) mit Stromversorgungsteil. Die Serumproteine trennten sich im Elektrophoresepuffer (Michaelispuffer, pH 8,6) innerhalb von 30 Min. bei einer angelegten Spannung von 250 Volt und einer Stromstärke von 10 mA. Mit einem Stempel (1 ul) wurden die Proben auf die eingespannte Folie aufgebracht, eine Rasterbrücke gewährleistete eine saubere Auftragetechnik. Die Proteinbanden wurden mit Amidoschwarz angefärbt.

Färbung: 4 - 5 Min. in gesättigter Amidoschwarz-B-Lösung in Methanol-Eisessig (9 : 1). Mehrmaliges Differenzieren der Folien durch Entfärbelösung (Methanol-Eisessig, 9 : 1). Fixieren der Celluloseacetatfolien auf einer Glasplatte bei 70 ^{o}C.

Die Auswertung erfolgte durch ein Densitometer (Zeiss KFE 4).

7.) Messung der CK-Aktivität

Die Bestimmung der Gesamt-CK-Aktivität erfolgte mit dem CK-Nac-aktivierten Test (Böhringer, Mannheim).
Das Testprinzip folgt der "Optimierten Standardmethode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.

Reaktionsablauf:

$$\text{I} \quad \text{Kreatinphosphat} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{CK}} \text{Kreatinin} + \text{ATP}$$

$$\text{II} \quad \text{Glukose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{Glukose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{III} \quad \text{Glukose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{G-6-P DH}} \text{Glukonat-6-phosphat} + \text{NADPH}^+ + \text{H}^+$$

Die Extinktion bestimmte man am Eppendorf-Photometer bei 334 nm (25 °C). Die Präzisions- und Richtigkeitskontrolle erfolgte mit Hilfe eines Standardserums mit einer definierten CK-Aktivität (Ortho Diagnostics, New Jersey).

Berechnung der CK-Aktivität:

$$U/l = 4207 \times \Delta E_{334} \text{ nm/min.}$$

8.) Darstellung CK-bindender IgG aus Patientenseren

A) Reinigung mittels Protein-A-Säule

3 ml Humanserum wurden zur Gewinnung "reiner" Ig-Globuline auf eine Protein-A-Sepharose Cl-4B (Pharmacia, Uppsala) aufgetragen und mit dem 5-fachen Bettvolumen gewaschen (Puffer I). Nach Erreichen eines proteinfreien Eluates (Kontrolle durch Bestimmung des Proteingehaltes) eluierte man die Antikörper der IgG-Klasse mit Puffer V. Die IgG-haltigen Fraktionen wurden auf doppelte Serumkonzentration eingeengt (Amicon B 15), neutralisiert mit 1N NaOH und bei - 20 °C gelagert.

B) Darstellung der Antikörper mittels Ausschluß-chromatographie

Drei Makro-CK-haltige Seren sowie ein Kontrollserum wurden zur Spaltung des Immunglobulin-CK-Komplexes mit 1N HCl auf pH 3,2 eingestellt und 30 Min. bei 20 °C inkubiert (Kontrolle der CK-Aktivität). Anschließend trug man die Seren auf eine Sephadex-G-200-Säule (80 x 2,5 cm) auf. Eluiert wurde mit Glycin-Puffer (pH 3,4). Den Proteingehalt des Eluates bestimmte kontinuierlich ein Durchfluß-photometer mittels UV-Absorption bei 254 nm. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 5,5 ml gesammelt; die so erhaltenen Proteinfraktionen wurden getrennt, auf Serumkonzentration eingeengt (Amicon B 15), neutralisiert (pH 7) und bei - 20 °C eingefroren. Als Nachweis für die jeweiligen Proteinzusammensetzungen diente eine Serumelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie.

9.) Aufspaltung der IgG-Immunglobuline in $F(ab')_2$- oder Fc-Untereinheiten

A) Pepsinspaltung zur Gewinnung von $F(ab')_2$-Untereinheiten

Humanes Makro-CK-Serum (4 ml, Pat. Rud.) sowie auf einer Protein-A-Säule (Pharmacia, Uppsala) gewonnenes IgG (Pat. Rud. Methode 8A) wurden mit 4 mg Pepsin E.C. 3.4.23.1 (Merck, Darmstadt) versetzt, auf pH 3 eingestellt und bei 37 °C im Brutschrank für 48 h inkubiert. Die CK-Aktivität wurde nach Abschluß der Pepsin-Spaltung und anschließender Neutralisation (pH 7, 1N NaOH) kontrolliert. Den Ansatz trug man dann auf eine Protein-A-Säule auf, um ungespaltene IgG-Antikörper sowie die abgetrennten Fc-Fragmente zurückzuhalten. Die nicht retinierten $F(ab')_2$-Fragmente wurden mit Puffer I, die abgetrennten Fc-Fragmente mit Puffer V eluiert, anschließend eingeengt und bei - 20 °C eingefroren.
Im Laufe der Versuche erwies es sich als vorteilhaft, bereits über eine Protein-A-Säule gereinigte Antikörper der IgG-Klasse mit Pepsin zu spalten.

B) Gewinnung von Fc-Fragmenten durch Papainspaltung

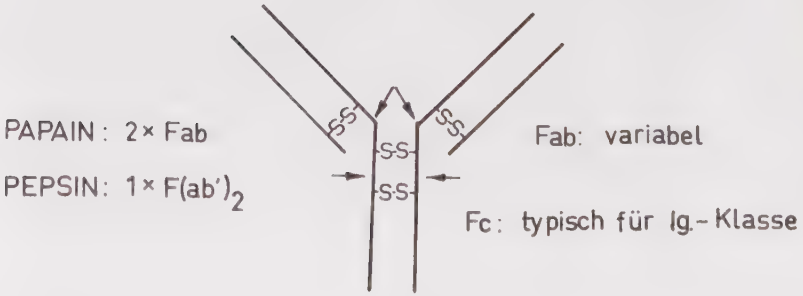
4 ml einer IgG-Lösung (Protein-A-Säule) und 1,2 mg Papain E.C.3.4.22.2 (Merck, Darmstadt) wurden 6 h bei 37 °C (pH 8) inkubiert, danach auf 4 °C abgekühlt (vergleiche PORTER, R., 1959, GODING, J.W., 1978). Ungespaltene IgG- und Fc-Fragmente wurden auf einer Protein-A-Säule (Puffer I) zurückgehalten und dann mit Puffer V eluiert. Eine Ausschlußchromatographie (Sephadex G-100 sf) trennte ungespaltenes IgG von den Fc-Fragmenten. Die Fraktionen 47 - 58 wurden gesammelt und auf 0,8 ml eingeengt (Amicon-Konzentrator), gesplittet und bei - 20 °C eingefroren.

10.) Immundiffusion nach Ouchterlony

In Agarosegel (Schichtdicke 2,5 mm) wurden Rosetten gestanzt. Die Diffusion von Proben und Antiseren erfolgte für 2 h bei Zimmertemperatur, danach wegen der Temperaturempfindlichkeit der CK im Kühlraum. Nach Ausbildung der Präzipitatsicheln wurde mit Puffer I über 24 h mehrfach gewässert. Anschließend erfolgte der Nachweis von CK-Aktivität (Sigma, CPK agaro-stain). Bei spezieller Fragestellung wurde eine Proteinfärbung (Coomassie Brillant Blue, Amido Schwarz) durchgeführt.

Benutzte Antiseren:

Anti human IgG (y-chains) Boehringer, Ingelheim
" " for μ-chains
" " kappa light chains
" " lambda light chains
" " IgG für Fc-Fragmente
Antiserum gegen humanes IgG/F(ab')$_2$, Behring Marburg
" " " Ig/ L-Kette, Typ λ
" " " Ig/ Fc
" " " Ig/ Fd



III ERGEBNISSE

1.) Präparation CK-BB-bindender Immunglobuline

A) Ausschlußchromatographie

Die Spaltung der Immunglobulin-G-CK-BB-Komplexe und die Inaktivierung des Enzymes erfolgte bei einem pH von 3,2 (Methode 8 B). Nach der anschließend durchgeführten Chromatographie (Sephadex G-200) stellten wir drei Proteinfraktionen (P_I bis P_{III}) her, die auf Serumkonzentration eingeengt und deren CK-Aktivitätsverlust kontrolliert wurde.

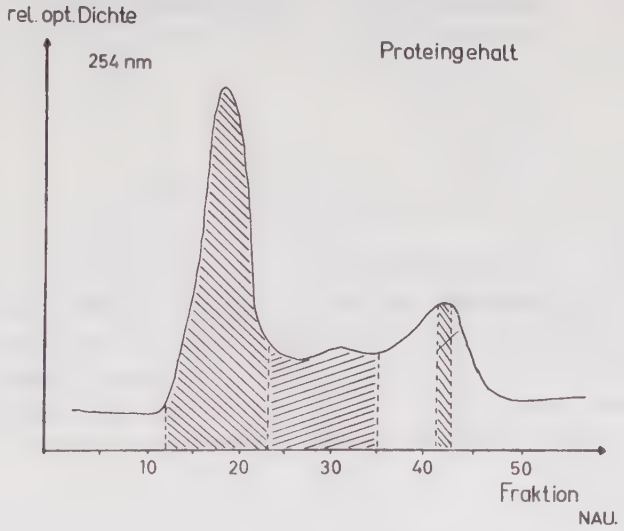


Abb. 2: Extinktionsprofil des Serum NauI in der Ausschlußchromatographie (Sephadex G-200, 80 x 2,5 cm) Fraktionen zu 6,5 ml, Messung der UV-Absorption bei 254 nm.

P I : Fraktion 12 - 23
P II : Fraktion 24 - 35
P III : Fraktion 42 - 43

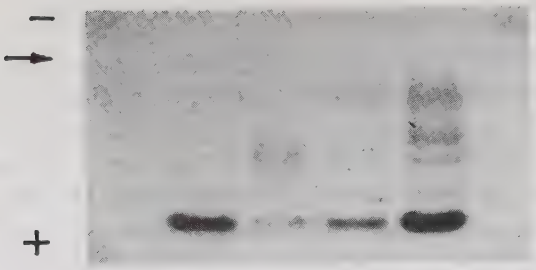


Abb. 3: Elektrophoretische Analyse der Peaks auf Cellulose-Acetatfolie. Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B, Auftragsmenge 0,2 µl Trennzeit 30 Min. bei 250 Volt, pH 8,6

1 P III
2 P I
3 P II
4 Serum Nau.I

In entsprechender Weise wurden zwei weitere Seren aufgetrennt (Makro-CK-Ämieserum Rud., Normalserum Kra.) und die Verteilung der verschiedenen Immunglobulinklassen in P I und P II durch eine nephelometrische Untersuchung der eingeengten Fraktionen bestimmt.

Tabelle 1: Quantitative nephelometrische Bestimmung der Immunglobuline in den eingeengten Fraktionen P I und P II (Rate-Nephelometer, Beckmann).

	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)
P I Rud.	144	34,5	42
P II Rud.	298	5	61
P I Nau.I	135	9	39
P II Nau.I	299	5	5
P I Kra.	253	11	70
P II Kra.	305	5	33

Einheit: mg/100 ml

In Peak I fanden sich die Immunglobuline der IgG-, IgM- und IgA-Klasse, in Peak II überwiegend die der IgG-Klasse.

B) Isolierung der CK-BB-bindenden Immunglobuline durch eine Affinitätschromatographie

Durch die spezifische Bindung von IgG an Protein-A-Sepharose CL-4B konnten diese Immunglobuline frei von übrigen Serumproteinen gewonnen werden. Als weiterer Vorteil zur oben beschriebenen Methode stellt sich der geringe Zeitaufwand sowie die gute Ausbeute dar.

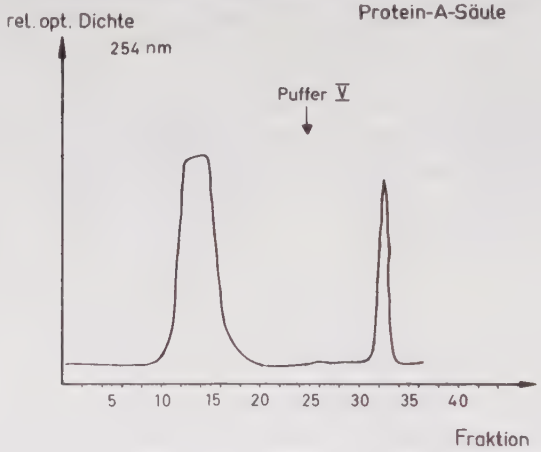


Abb. 4: Isolierung von Immunglobulin G, Subklasse 1,2 und 4, aus 3 ml Serum Rud. durch eine Protein-A-Sepharose CL-4B-Säule (4 x 0,9 ml). Fraktionsvolumen: 0,45 ml.

In der zur Kontrolle durchgeführten Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien stellten sich als einzige Proteinbande die Gammaglobuline (IgG) dar.

2.) Proteolytische Spaltung CK-BB-bindender IgG

A) Pepsinspaltung

Gereinigte Ig-Globuline aus 4 ml Serum (Rud.) trennte man nach der Pepsinspaltung über eine Protein-A-Säule (Methode 9 A).

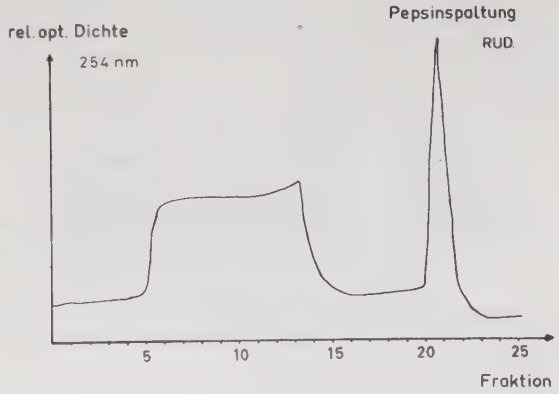


Abb. 5: Trennung von IgG-Bruchstücken nach Pepsinspaltung (2-ml-Fraktionen)

Peak A: Fraktion 5 bis 14
Peak B: Fraktion 21 bis 22

Die durch das Trägermaterial der Säule (Staphylokokken-Protein A) nicht zurückgehaltenen $F(ab')_2$-Bruchstücke erscheinen als breite Bande in den Fraktionen 5 - 14. Sonstige Fragmente und ungespaltene Antikörper wurden mit Glycinpuffer (pH 3) in den Fraktionen 21 und 22 gesammelt. Die endgültige Reinigung der $F(ab')_2$-Präparation erfolgte mit einer Sephadex-G-300-sf-Säule.

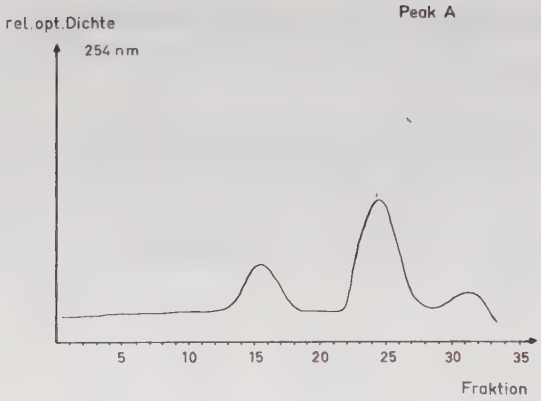


Abb. 6: Chromatographie von Peak A an Sephadex G 300 sf (20 x 0,9 cm), Fraktionsvolumen: 0,45 ml

Fraktion F_1: Glas 15 bis 17

Fraktion F_2: Glas 23 bis 26

Die Fraktionen F_1 sowie F_2 wurden eingeengt und immunologisch identifiziert. Dabei stellte sich heraus, daß Peak A frei von Fc-Anteilen war, Peak B jedoch noch ungespaltene IgG enthielt. Alle Fraktionen waren CK-frei.

B) Papainspaltung

Zur Herstellung von Fc-Fragmenten wurden die Immunglobuline aus 4 ml Serum Rud. mit 1,2 mg Papain gespalten.

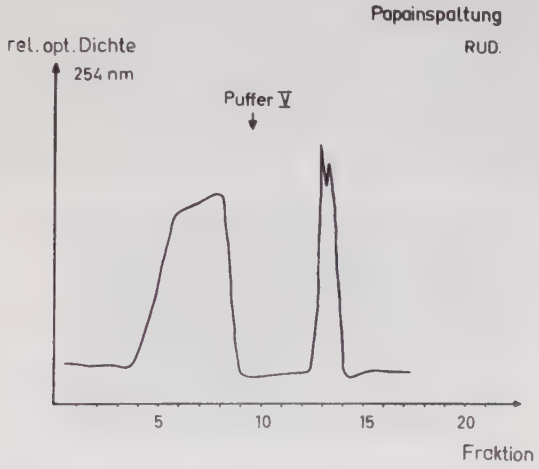


Abb.7: Affinitätschromatographie papaingespaltener IgG Rud. durch Protein-A-Sepharose CL-4B (4 x 0,9 cm).
Fraktionsvolumen: 0,45 ml
Papainspaltung: 1,2 mg Papain auf 4 ml Serum Rud., pH 8,6 h bei Raumtemperatur

Peak C: Fraktion 4 - 9
Peak D: Fraktion 13 und 14

Fc-Fragmente und ungespaltene IgG wurden mit Puffer V vom Protein A gelöst und erschienen als Peak D im Eluat. Um die Fc-Stücke von noch intakten Antikörpern zu trennen, trug man den eingeengten Peak D auf eine Ausschlußchromatographiesäule auf.

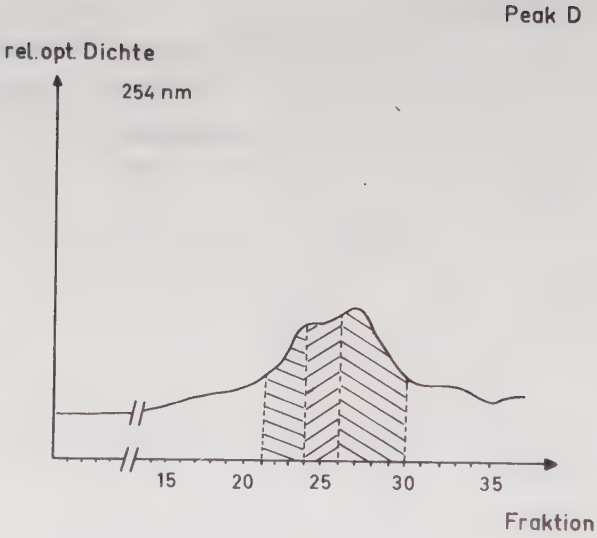


Abb. 8: Ausschlußchromatographie papaingespaltener IgG Rud. (Peak D) durch Sephadex G 300-sf (20 x 0,9 cm, Fraktionsvolumen: 0,45 ml).

Fraktion F_1: Glas 21 bis 24

Fraktion F_2: Glas 25 bis 26

Fraktion F_3: Glas 27 bis 30

Eine vollständige Auftrennung zwischen unverdauten Immunglobulinen und Fc-Fragmenten wurde nach dem Elutionsprofil (Abb. 8) nicht erreicht. Um dennoch eine gewisse Separierung zu erreichen, unterteilte man das Eluat in drei Fraktionen (F_1 - F_3), die getrennt auf Serumkonzentration eingeengt wurden. CK-Aktivität war in keiner Fraktion mehr nachzuweisen.

3.) Koppelung isolierter CK-BB-bindender Immunglobuline mit CK-Isoenzymen

Im folgenden wurde die Bindung der CK-Isoenzyme an isolierten Immunglobulinpräparaten aus drei Makro-CK-haltigen Seren untersucht. Die Immunglobuline wurden durch acidolytische Spaltung der Makro-CK-Seren Doe., Nau., Rud. sowie eines Normalserums Kra. und folgender Ausschlußchromatographie (Sephadex G-200) gewonnen.

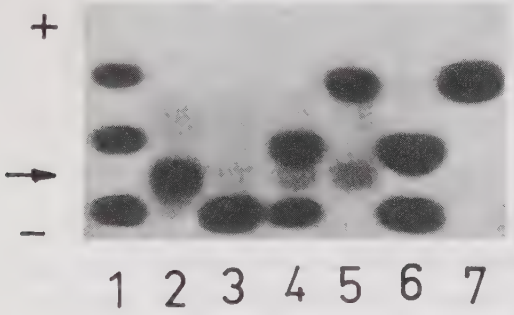


Abb. 9: Koppelung isolierter CK-bindender Immunglobuline (Pat. Nau.) mit CK-Isoenzymen. 100 µl Immunglobulin-Präparation (Peak II) wurden mit 100 µl einer Isoenzymlösung (450 U/l) versetzt und zwei Stunden bei 8 °C inkubiert.

1	Standard (Sigma, 5 µl)	
2	Makro-CK Pat. Nau.	8 µl
3	Immunglobuline Nau. + CK-MM	12 µl
4	Immunglobuline Nau. + CK-MB	12 µl
5	Immunglobuline Nau. + CK-BB	12 µl
6	CK-MB-Präparation	15 µl
7	CK-BB-Präparation	15 µl

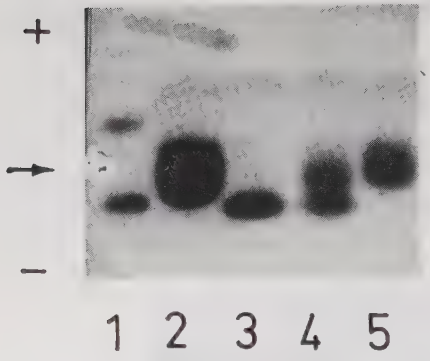


Abb.10: Koppelung isolierter CK-bindender Immunglobuline (Pat. Rud.) mit CK-Isoenzymen.
100 µl Immunglobulin Präparation (Peak II) wurden mit 100 µl einer Isoenzymlösung versetzt und zwei Stunden bei 8 °C inkubiert.
Auftragsmenge 12 µl.

1 Standard

2 Makro-CK Pat. Rud.

3 Immunglobuline Nau. + CK-MM

4 Immunglobuline Nau. + CK-MB

5 Immunglobuline Nau. + CK-BB

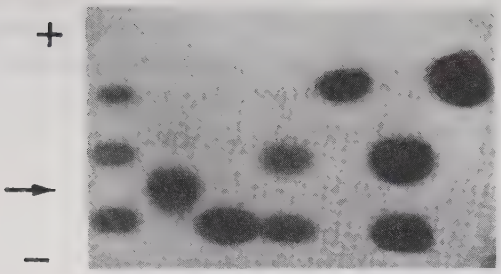


Abb. 11: Koppelung isolierter Immunglobuline (Normalserum Kra.) mit CK-Isoenzymen.
Versuchsbedingungen siehe Abb. 9.

1	Standard (Sigma, 5 µl)	
2	Makro-CK Pat. Rud.	8 µl
3	Immunglobuline Kra. + CK-MM	12 µl
4	Immunglobuline Kra. + CK-MB	12 µl
5	Immunglobuline Kra. + CK-BB	12 µl
6	CK-MB-Präparation	15 µl
7	CK-BB-Präparation	15 µl

Die IgG-Fraktion der Makro-CK-Seren Nau.I und Rud. bilden mit CK-BB eine deutliche Makrobande; weiterhin zeigt sich, daß die AK-Rud. und wesentlich schwächer AK-Nau.I das Isoenzym CK-MB binden, wobei die Makro-CK-MB eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität zeigt (Abb. 10, AK-Rud.). Die Antikörper Kra. (Kontrollserum) bilden mit keinem Isoenzym eine Makro-CK-Bande.

Zusätzlich zeigte die Kontrolle von CK-MB und CK-BB, daß CK-BB isoenzymrein war, während CK-MB durch CK-MM verunreinigt vorlag. Dies könnte auf eine Dissoziation der CK-MB in die Monomere B und M und eine Rekombination in CK-MM und CK-BB hindeuten, wobei eine CK-BB als das wesentlich empfindlichere Enzym inaktiviert wird.

Um die Möglichkeit einer schwachen Makro-CK-MB-Bildung bei AK-Doe. und Nau.I zu testen, wurde der Bindungsversuch mit einer wesentlich erhöhten CK-MB-Aktivität (3700 U/l im Ansatz) wiederholt. Die CK-MB wurde vor dem Versuch frisch gewonnen.

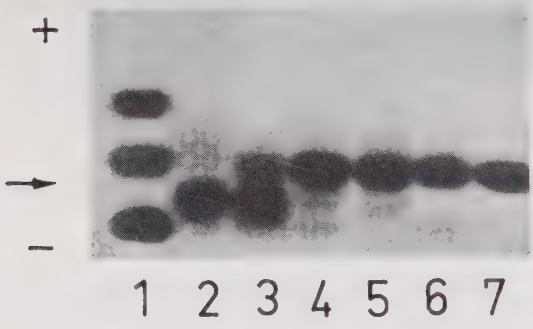


Abb. 12: Koppelung isolierter Immunglobuline der Seren (Rud., Nau., Doe. und Kra.) mit CK-MB (3700 U/l im Ansatz).

1	Standard	
2	Makro-CK Pat. Nau.	9 µl
3	Immunglobuline Rud. + CK-MB	15 µl
4	Immunglobuline Nau. + CK-MB	15 µl
5	Immunglobuline Doe. + CK-MB	15 µl
6	Immunglobuline Kra. + CK-MB	15 µl
7	CK-MB-Präparation	8 µl

Abb. 12 stellt die unterschiedlichen Bindungsverhalten der Immunglobuline (Rud., Nau., Doe) in Bezug auf die Anlagerung von CK-MB dar. Die Elektrophorese zeigt eine deutliche Interaktion mit den Immunglobulinen des Serums Rud., während die Immunglobuline der anderen geprüften Seren erheblich weniger CK-MB koppeln können.

Die IgG eines Normalserums (Kra) zeigen dagegen erwartungsgemäß keinerlei CK-MB-Bindung. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden bei 4 ^{o}C ergab keine Veränderung des elektrophoretischen Enzymmusters.

4.) Sättigungsverhalten isolierter Antikörper (Rud.) mit CK-BB

Hierbei wurden gereinigte IgG des Serums Rud. (20 ul) mit steigenden Aktivitäten an CK-BB (20 ul, 0 - 260 U/l im Ansatz) versetzt.

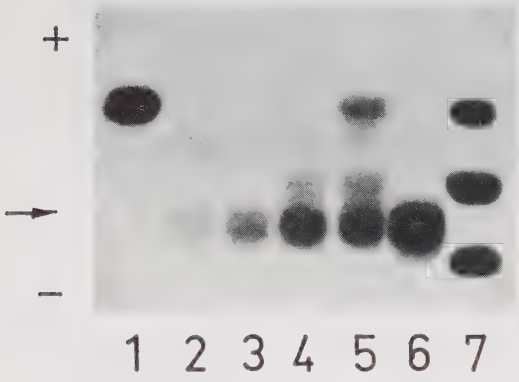


Abb. 13: Sättigung Makro-CK-bildender IgG (Serum Rud.) durch steigende Aktivitäten von CK-BB. Inkubationsdauer 2 Stunden bei 8 °C. Auftragsmenge je 15 µl.

1 CK-BB-Präparation (400 U/l), 10 µl
2 IgG Pat. Rud. + 50 U/l CK-BB im Ansatz
3 IgG Pat. Rud. + 100 U/l CK-BB im Ansatz
4 IgG Pat. Rud. + 200 U/l CK-BB im Ansatz
5 IgG Pat. Rud. + 260 U/l CK-BB im Ansatz
6 Makro-CK Rud.
7 Standard (Sigma, 5 µl)

Die Präparation aus dem Serum Rud. zeigt gegenüber dem nativen Serum eine erniedrigte Bindungskapazität für CK-BB (rund 200 U/l). Dies könnte durch den Verlust bzw. die Denaturierung von IgG bei der Präparation erklärt werden. Auffallend war das Auftreten einer zusätzlichen "CK-MB-Fraktion" in den Ansätzen III und IV. Da IgG-Präparation und eingesetzte CK-BB absolut frei von CK-MB waren, ist eine Verunreinigung der Ansätze durch CK-MB auszuschließen.

5.) Sättigungsverhalten nativer Makro-CK-Seren mit CK-BB

Um die freie Bindungskapazität der Makro-CK-Seren zu quantifizieren, versetzte man sie stufenweise bis 160 U/l mit CK-BB. Die zweite Fragestellung war, ob in ungesättigten Makro-CK-Seren neben CK-BB auch CK-MB an der Komplexbildung beteiligt ist. In diesem Fall müßte die CK-MB durch die zugefügte CK-BB aus ihrem Makro-Komplex gedrängt werden.

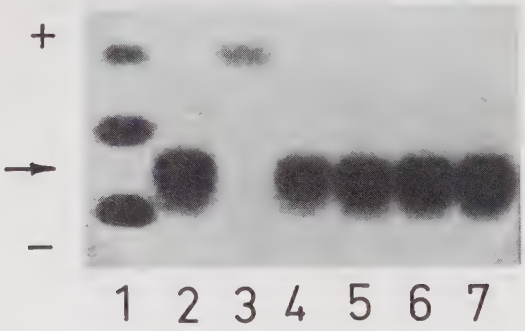


Abb. 14: Aufsättigung von Makro-CK-Serum Rud. durch CK-BB. 20 µl Makro-CK-Serum Rud. wurden mit 20 µl CK-BB steigender Aktivität vermischt und 2 Stunden bei 8 °C inkubiert. Auftragsmenge je 15 µl.

1 Standard (Sigma), 5 µl
2 Makro-CK Rud.
3 CK-BB-Präparation (160 U/l)
4 Makro-CK Rud. + CK-BB (20 U/l)
5 Makro-CK Rud. + CK-BB (40 U/l)
6 Makro-CK Rud. + CK-BB (80 U/l)
7 Makro-CK Rud. + CK-BB (160 U/l)

Die Aktivitätsangaben der zugesetzten CK-BB beziehen sich auf die Mischaktivität der CK-BB im Ansatz.

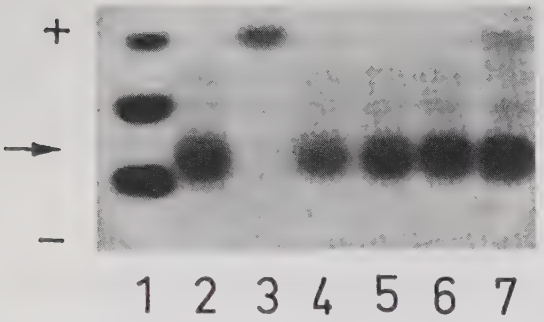


Abb. 15: Aufsättigung von Makro-CK-Serum Nau.I durch steigende Aktivitäten an CK-BB. Versuchsbedingungen siehe Abb. 14.

1 Standard (Sigma), 5 µl
2 Makro-CK Nau.
3 CK-BB-Präparation (160 U/l)
4 Makro-CK Nau. + CK-BB (20 U/l)
5 Makro-CK Nau. + CK-BB (40 U/l)
6 Makro-CK Nau. + CK-BB (80 U/l)
7 Makro-CK Nau. + CK-BB (160 U/l)

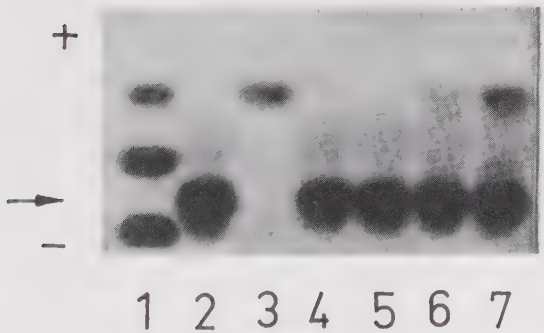


Abb. 16: Aufsättigung von Makro-CK-Serum Doe. durch steigende Aktivitäten an CK-BB. Versuchsbedingungen siehe Abb. 14.

1 Standard (Sigma), 5 µl
2 Makro-CK Doe.
3 CK-BB-Präparation (160 U/l)
4 Makro-CK Doe + CK-BB (20 U/l)
5 Makro-CK Doe + CK-BB (40 U/l)
6 Makro-CK Doe + CK-BB (80 U/l)
7 Makro-CK Doe + CK-BB (160 U/l)

Die Sättigungsversuche zeigen:

a) Die freien Bindungskapazitäten nativer Makro-CK-Seren sind unterschiedlich.

b) Die Makro-CK ungesättigter Patientenseren setzen sich zumindest in zwei Fällen (Nau.I, Doe.) sowohl aus Makro-CK-BB als auch aus Makro-CK-MB zusammen.

Die Makro-CK-Seren und damit die CK-BB-bindenden IgG sind in den Inkubationsansätzen 1 : 1 verdünnt worden, die wahren Sättigungstiter liegen deshalb doppelt so hoch, als in der Elektrophorese bestimmt wurde.

Das Makro-CK-Serum Rud. ist in der Lage, über 320 U/l CK-BB zusätzlich zu binden, ohne daß freie CK-BB auftritt. In einem späteren Versuch konnte bis zu 520 U/l CK-BB keine Absättigung erreicht werden. Im Gegensatz dazu ist das Makro-CK-Serum Nau.I bereits bei einem Titer von 80 U/l soweit abgesättigt, daß CK-MB aus dem Makro-Komplex freigesetzt wird (Abb. 15, Pos. 5). Im Bereich zwischen 160 und 320 U/l CK-BB erscheint zunehmend freie CK-MB, und erst nach ihrer vollständigen Verdrängung aus dem Komplex ist auch die CK-BB als freies Isoenzym nachweisbar (Abb. 15, Pos. 7). Das Makro-CK-Serum Doe. verhält sich entsprechend, nur mit dem Unterschied, daß freie CK-BB bereits ab einem Titer von 160 U/l nicht mehr von den Immunglobulinen abgesättigt wird. Auch hier wird die CK-MB durch ihre geringere Affinität zum Immunglobulin G aus dem Makro-Komplex gedrängt.

Berechnet man den Sättigungsgrad der CK-bindenden IgG im nativen Serum, so erhält man für Rud. eine Sättigung von unter 33 % (CK-BB-Aktivität des Serum Rud.: 250 U/l), für Nau. eine Sättigung von 50 % (CK-BB-Aktivität des Serum Nau.: 170 U/l) und für Doe. eine Sättigung von 43 % (CK-BB-Aktivität des Serum Doe.: 60 U/l).

6.) Verdrängung komplexgebundener CK-MB durch CK-BB

Aus isoliertem IgG (Rud., Protein-Peak II) und CK-MB wurde in vitro Makro-CK-MB hergestellt. Um die Bindungsaffinität der Immunglobuline (Rud.) gegenüber CK-MB und CK-BB abzuschätzen, wurden danach steigende Aktivitäten von CK-BB zugesetzt.

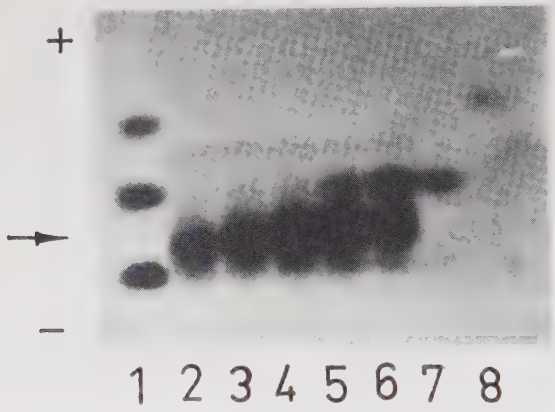


Abb. 17: Kompetitionsversuch: Verdrängung von CK-MB durch CK-BB aus der Komplexform.
Inkubationsbedingungen: 8 °C über 2 Stunden.
Auftragsmenge: 15 µl, Standard 5 µl

1 Standard
2 IgG + CK-MB (150 U/l)
3 IgG + CK-MB (150 U/l) + CK-BB (30 U/l)
4 IgG + CK-MB (150 U/l) + CK-BB (60 U/l)
5 IgG + CK-MB (150 U/l) + CK-BB (120 U/l)
6 IgG + CK-MB (150 U/l) + CK-BB (150 U/l)
7 CK-MB (150 U/l)
8 CK-BB (150 U/l)

CK-MB war durch CK-MM verunreinigt, was für den Kompetitionsversuch ohne Bedeutung war. Der Makro-CK-Komplex wandert mit zunehmender Verdrängung der CK-MB durch CK-BB anodenwärts. Dadurch wird die Verunreinigung mit CK-MM zunehmend sichtbar. Bei Zugabe höherer CK-BB-Aktivitäten (Abb. 17, Spur 5) wird CK-MB aus dem Makro-CK-Komplex verdrängt. Freie, ungebundene CK-BB war in keinem Ansatz nachzuweisen. Dies bedeutet, daß die beiden Isoenzyme CK-BB und CK-MB um die gleiche Bindungsstelle am enzymbindenden Antikörper konkurrieren. Offenbar besitzt jedoch CK-BB eine erheblich höhere Bindungsaffinität: denn bei gleichen Aktivitäten der Isoenzyme (Abb. 17, Spur 6) liegt CK-BB ausschließlich in der Komplexform vor, während CK-MB jetzt größtenteils aus der Komplexform verdrängt, in freier Form in der Elektrophorese nachweisbar ist.

7.) Verdrängung von CK-BB aus Makro-CK-BB-Serum durch CK-MB

In dieser Testreihe wurde versucht, die im nativen Makro-CK-Serum gebundene CK-BB durch sehr hohe CK-MB-Konzentrationen aus dem Makro-CK-Komplex zu verdrängen. Getestet wurden die Makro-CK-Seren der Patienten Rud., Nau.I und Doe.

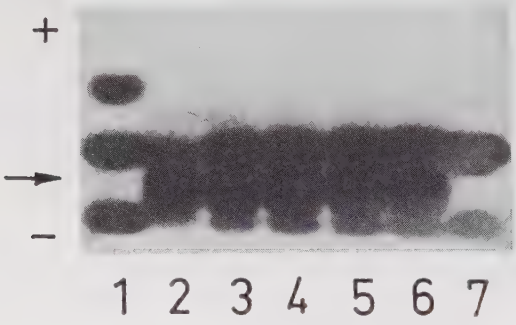


Abb. 18: Kompetitionsversuch im nativen Makro-CK-haltigen Serum (Rud.) durch CK-MB. Inkubationsbedingungen: 8 °C über 2 Stunden. Auftragsmenge: 10 µl, Standard 5 µl.

1 Standard
2 Makro-CK-Serum + CK-MB, 400 U/l im Ansatz
3 Makro-CK-Serum + CK-MB, 800 U/l im Ansatz
4 Makro-CK-Serum + CK-MB, 1200 U/l im Ansatz
5 Makro-CK-Serum + CK-MB, 1600 U/l im Ansatz
6 Makro-CK-Serum + CK-MB, 2000 U/l im Ansatz
7 CK-MB (2000 U/l)

In dem untersuchten Serum war es nicht möglich, die endogen gebundene CK-BB durch steigende Aktivitäten an CK-MB aus ihrem Makro-Komplex zu drängen. Auch bei zwei weiteren Makro-CK-Ämieseren (Nau., Doe.) wurde, mit einer gegenüber der Serumaktivität 16mal höheren CK-MB-Aktivität, keine freie CK-BB beobachtet.

Endogen gebundene CK-MB kann in ungesättigten Makro-CK-Seren zwar durch zugefügte CK-BB aus dem Makro-Komplex gedrängt werden (vgl. II,5), der umgekehrte Weg ist durch die wesentlich geringere Affinität des Immunglobulines für die CK-MB nicht möglich.

Die Verunreinigung der CK-MB mit CK-MM war für den Versuch ohne Bedeutung.

8.) Charakterisierung der CK-IgG-Bindung durch immunologische Untersuchungen

A) Fällung der IgG-CK-BB-Komplexe durch Staphylococcen-Protein A.

Das freie Ende des enzymgebundenen IgG bestimmte man durch eine Affinitätschromatographie des Komplexes an Staphylococcen-Protein A. Das aus der Zellwand von Staphylococcus aureus isolierte Protein bindet zwei IgG-Moleküle spezifisch an ihren F_c-Stücken.

Hierzu wurden 1 ml isolierter IgG (Makro-CK-Ämieserum Rud.) mit 1 ml radioaktiv markierter CK-BB inkubiert (30 Min. bei 8 °C). In der nachfolgenden Affinitätschromatographie wurden etwa 75 % der eingesetzten Aktivität von der Säule zurückgehalten. Diese Aktivität entsprach den gebildeten Makro-CK-Komplexen und konnte nur durch eine Acidolyse bei pH 3,4 eluiert werden. Folglich sind die F_c-Bereiche der gebundenen IgG frei.
Bei nicht CK-BB-bindenden IgG (Normalserum Kra.) wurde keine Aktivität durch die Säule zurückgehalten.

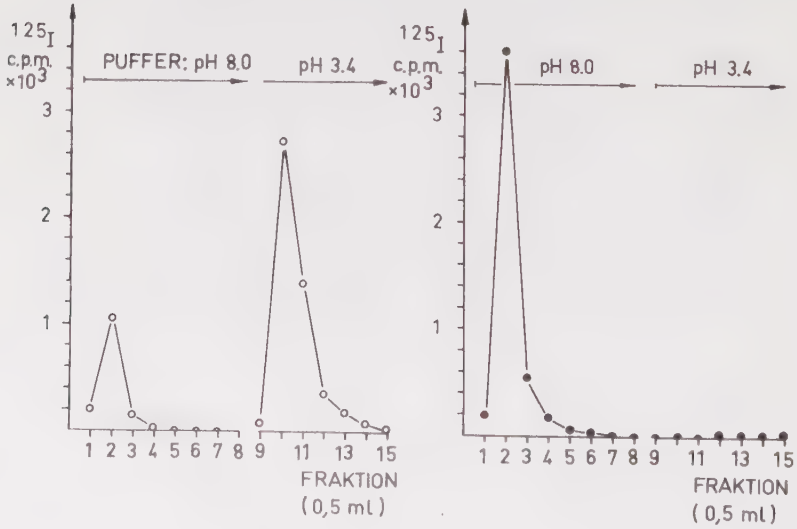
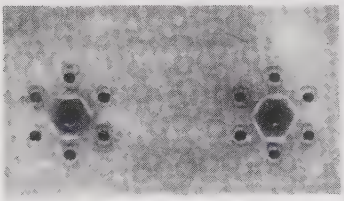


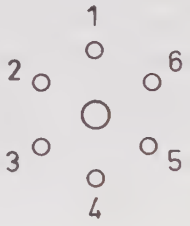
Abb. 19: Affinitätschromatographie der markierten CK-IgG-Komplexe.

links: CK-BB (markiert) + IgG (Serum Rud.)
rechts: CK-BB (markiert) + IgG (Normalser. Kra.)
Protein-A-Sepharose Cl-4B-Säule, 4 x 0,9 cm.
Fraktionsvolumen: 0,5 ml
Inkubationsdauer: 30 Min. bei 8 °C.

B) Makro-CK-Komplexe aus pepsingespaltenem Serum (Rud.)

Serum Rud. wurde nach Pepsinspaltung über eine Sephadex-Protein-A-CL-4B-Säule aufgetrennt. Die $F(ab')_2$-Bruchstücke bildeten in der Elektrophorese sowohl mit CK-BB als auch mit CK-MB eine deutlich Makro-Fraktion. Darüber hinaus band jedoch auch die F_c-Präparation beide Isoenzyme.
Anschließend erfolgte die immunologische Identifizierung dieser Enzymkomplexe.





A B

Abb. 20: Identifizierung der Komplexe aus IgG- Fragmenten und CK-Isoenzymen (Ouchterlony-Technik)
Originalfotografie der Präzipitationssicheln
zentrales Loch: A 20 ul Anti-F_c-Serum (Behring)
B 20 ul Anti-F_{ab}-Serum (Behrg.)
peripheres Loch: jeweils 10 µl

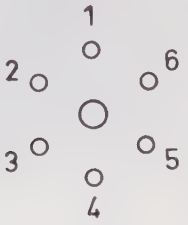
1	IgG (Rud.)	+ CK-BB
2	$F(ab')_2$	+ CK-BB
3	F_c	+ CK-BB
4	F_c	+ CK-MB
5	$F(ab')_2$	+ CK-MB
6	IgG (Rud.)	+ CK-MB

Die CK-Aktivität in den Ansätzen wurde auf 200 U/l eingestellt.

In allen Proteinsicheln war anschließend CK-Aktivität nachweisbar. Es liegen also Komplexe aus CK mit IgG-Spaltprodukten vor, die durch spezifische Antiseren gefällt wurden.
Aus der Anordnung der Präzipitationssicheln geht hervor, daß die $F(ab')_2$-Bruchstücke frei von F_c-Bruchstücken und intakten Antikörpern waren. Der Nachweis von CK-Aktivität in den Sicheln beweist eine Bildung von Komplexen zwischen den $F(ab')_2$-Fragmenten und CK-BB oder CK-MB.
Die unerwartete Reaktion zwischen der F_c-Fraktion und CK muß durch die Bindung von ungespaltenen IgG erklärt werden, die bei der Präparation nicht von der F_c-Fraktion getrennt werden konnten.

C) Makro-CK-Komplexe aus pepsingespaltenen IgG (Rud.)

Die Komplexe aus IgG-Bruchstücken und den CK-Isoenzymen wurden mit verschiedenen Antiseren, die gegen den F_c- oder F_{ab}-Anteil des IgG und solchen, die gegen bestimmte Proteinketten des Immunglobulins gerichtet waren (Anti-F_d-Ketten-, Anti-gamma-Ketten-, Anti-kappa-Ketten- und Anti-lambda-Ketten-Serum) präzipitiert (Ouchterlony-Technik). Anschließend erfolgte der Nachweis von CK-Aktivität in den Präzipitationssicheln.

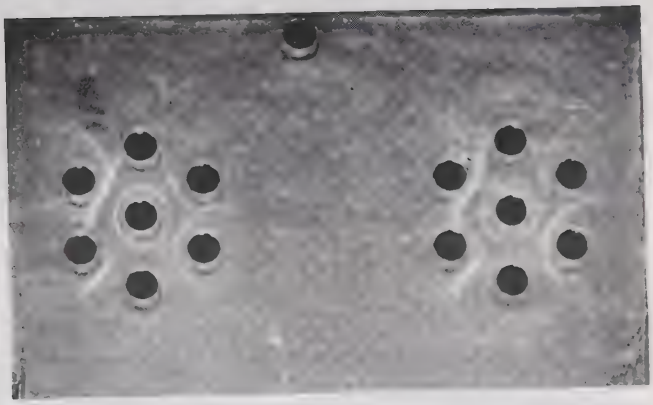


1 Anti-F_c-Serum
2 Anti-F_{ab}-Serum
3 Anti-F_d-Ketten-Serum
4 Anti-gamma-Ketten-Serum
5 Antiserum gegen Leichtketten vom Kappa-Typ
6 Antiseren gegen Leichtketten vom Lambda-Typ

Die Antiseren, 15 - 20 µl, wurden in der Peripherie, die Bindungsansätze, 20 µl, im Zentrum der Rosetten aufgetragen.

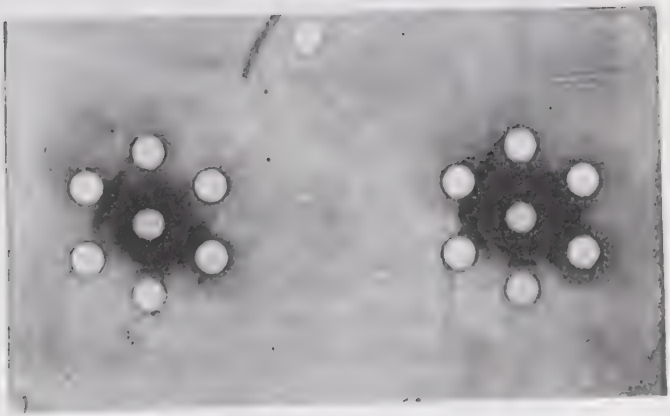
CK-MB CK-BB

A



CK-MB CK-BB

B



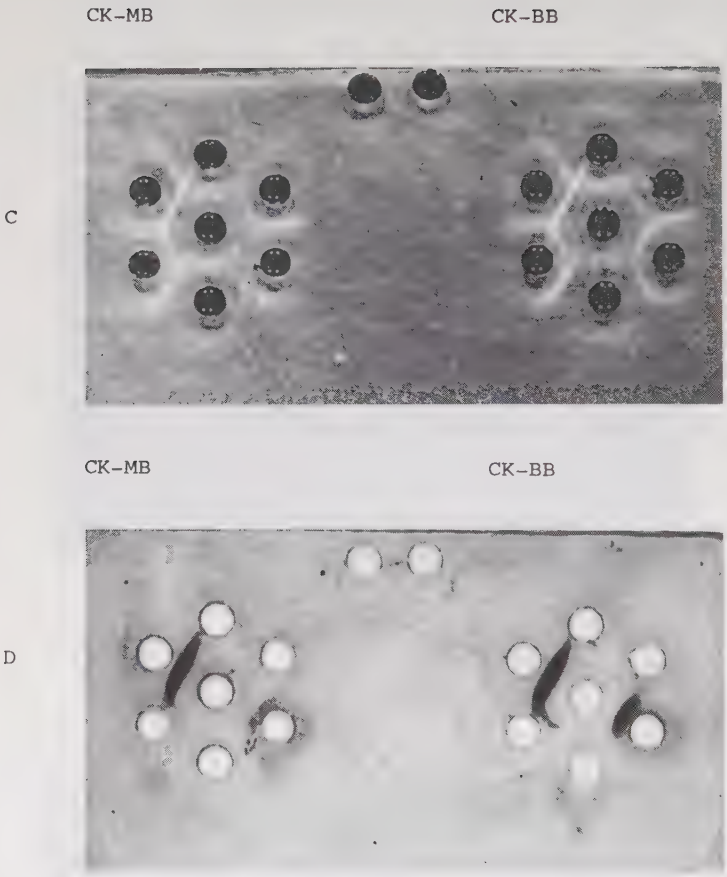


Abb. 21: Immunologische Identifizierung der Komplexe aus IgG-Fragmenten und der CK-Isoenzyme CK-BB und CK-MB.

A Präzipitationssicheln, Pepsinspaltung Serum Rud. + CK-MB / BB

B CK-Färbung, Pepsinspaltung Serum Rud. + CK-MB / BB

C Präzipitationssicheln, Pepsinspaltung IgG Rud. + CK-MB / BB

D CK-Färbung, Pepsinspaltung IgG Rud. + CK-MB / BB

Die Antiseren, 15 - 20 µl, wurden in der Peripherie, die Bindungsansätze, 20 µl, im Zentrum der Rosetten aufgetragen.
Ansätze mit CK-MB finden sich links, jene mit CK-BB rechts.

Neben der immunologischen Untersuchung der $F(ab')_2$-Makro-CK-Formen wurde ihr elektrophoretisches Verhalten überprüft (Abb. 23, A - B, Spur 2, 3, 4). Hierbei zeigten beide Isoenzyme (CK-BB und CK-MB) ein makro-typisches Muster; ihre elektrophoretische Mobilität lag zwischen CK-MM und CK-MB.

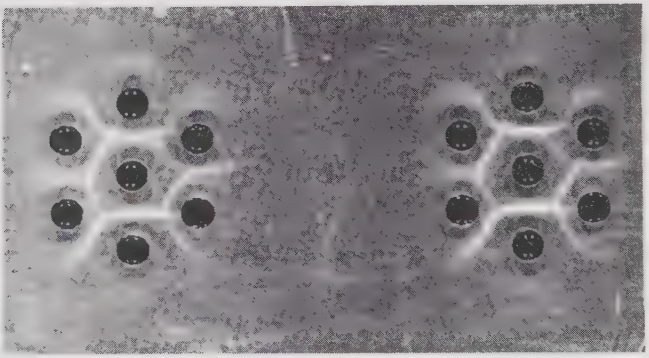
Die durch Pepsinverdauung gewonnenen $F(ab')_2$-Präparationen, sowohl aus Serum als auch isolierten IgG (Makro-CK-Serum Rud.) konnten mit Antiseren gegen den F_{ab}-Anteil gefällt werden. Weitere Sicheln entwickelten sich mit den Antiseren gegen die Leichtketten vom Kappa- und schwächer vom Lambda-Typ. Mit Anti-F_c- und Anti-gamma-Seren bildeten sich keine Präzipitate; folglich liegen ausschließlich $F(ab')_2$- Stücke beider Leichtketten-Reihen vor.

CK-Aktivität ließ sich nur in den durch Anti-F_{ab}- und Anti-L_{kappa}-Seren erhaltenen Proteinsicheln nachweisen, nicht jedoch bei der von Anti-L_{lambda} gebildeten Sichel. Dieser Befund war in den Ansätzen mit CK-BB und CK-MB zu erheben, quantitativ war er aber in den Ansätzen mit CK-BB stärker ausgeprägt. Dies bedeutet, ein Makro-CK-bildendes IgG der L_{kappa}-Klasse bindet sowohl bei der CK-BB als auch bei CK-MB ausschließlich mit seinem F_{ab}-Teil; die Bindung ist also spezifisch.

D) Makro-CK-Komplexe aus papaingespaltenem IgG (Rud.)

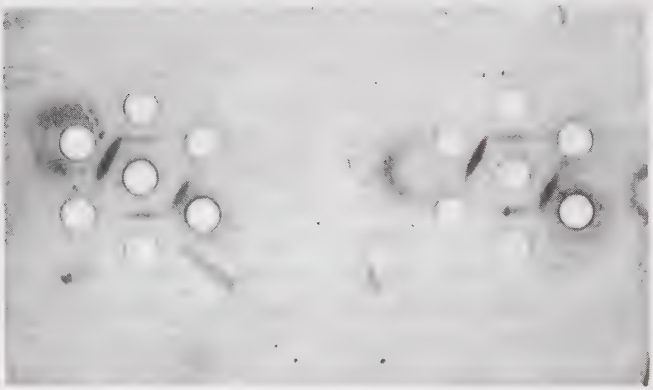
Die durch Papain gespaltene IgG-Fraktion 1 (vgl. 2 B, Abb. 8) bildete mit allen Antiseren, besonders stark mit Anti-F_c, mit Anti-F_{ab}, Anti-gamma und Antiseren gegen Leichtketten vom Kappa-Typ Präzipitationssicheln. Folglich sind die F_c-Fragmente durch ungespaltene IgG verunreinigt. Entsprechend hierzu fanden sich in den Präzipitationssicheln mit Anti-F_c, Anti-F_{ab}, Anti-gamma und mit dem Antiserum gegen Leichtketten vom Kappa-Typ CK-Aktivität.

A



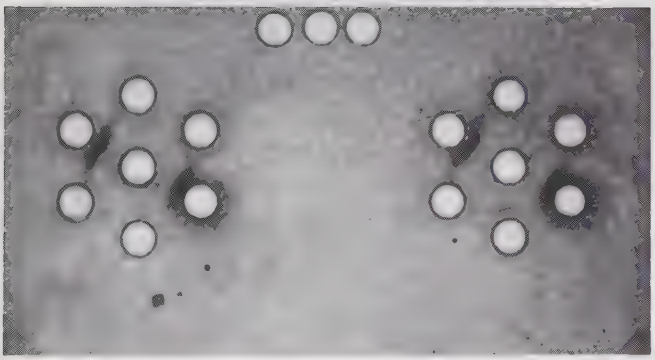
CK-MB CK-BB

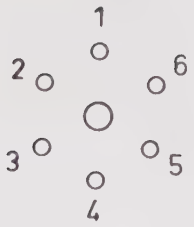
B



C

D





1 Anti-F_c-Serum
2 Anti-F_{ab}-Serum
3 Anti-F_d-Serum
4 Anti-gamma-Ketten-Serum
5 Antiserum gg. Leichtketten vom Kappa-Typ
6 Antiserum gg. Leichtketten vom Lambda-Typ

Abb. 22: Immunologische Identifizierung der Komplexe aus IgG-Fragmenten (Serum Rud.) und CK-Isoenzymen in der Ouchterlony-Technik.

A Präzipitationssicheln von F_1 (Papainspaltung) + CK-MB oder CK-BB
B CK-Färbung von A
C Präzipitationssicheln von F_2 (Papainspaltung) + CK-MB oder CK-BB

Die Antiseren, 20 µl, wurden in der Peripherie, die Ansätze, 20 µl, im Zentrum der Rosetten aufgetragen. Ansätze von CK-MB finden sich links, jene mit CK-BB rechts.

Die Fraktion F_2 ergab eine mit F_1 vergleichbare Verteilung der Präzipitationssicheln. Im Gegensatz zu F_1 ließ sich in F_2 CK-Aktivität nur in den von Anti-F_{ab} und Anti-L_{kappa} gebildeten Sicheln nachweisen. Folglich können die in F_2 präzipitierten F_c-Anteile nicht zu intakten IgG gehören, da sonst, entsprechend zu F_1, sich CK-Aktivität auch in der durch Anti-F_c erzeugten Sichel finden müßte. Also sind in F_2 keine intakten IgG mehr enthalten, sondern es liegt lediglich ein Gemisch aus F_{ab}- und F_c-Fragmenten vor, das durch die Ausschlußchromatographie nicht vollständig voneinander getrennt wurde.
Die F_{ab}-Fragmente der Papainspaltung können also ebenfalls - im Gegensatz zu den F_c-Stücken - CK-BB und CK-MB binden.

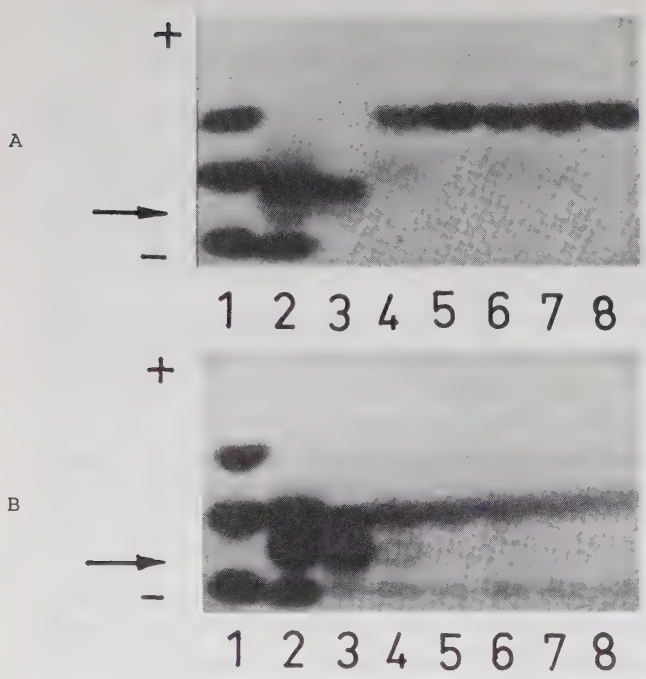


Abb. 23: Elektrophoretische Kontrolle der Bindung von CK-BB und CK-MB durch die aus Papain- und Pepsinspaltung gewonnenen IgG-Fragmente. Jeweils 25 µl IgG-Fragmente und 20 µl der Enzympräparation (A: Ansätze mit CK-BB, B: Ansätze mit CK-MB) wurden 90 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und elektrophoretisch getrennt. Auftragsmenge jeweils 15 µl.

1 Standard (Sigma), 8 µl
2 $F(ab')_2$ aus Serumspaltung Rud.
3 $F(ab')_2$, Peak A Pepsinspaltung IgG Rud.
4 Fraktion 2 Pepsinspaltung IgG Rud.
5 Fraktion F_1 Papainspaltung IgG Rud.
6 Fraktion F_2 Papainspaltung IgG Rud.

7 Fraktion F_3 Papainspaltung IgG Rud.
8 Fraktion F_o Pepsinspaltung

Alle $F(ab')_2$-Fraktionen bildeten mit CK-BB und CK-MB deutlich Makro-CK. Dieser Effekt war besonders bei Benutzung der hochgereinigten $F(ab')_2$-Fraktion aus Antikörpern deutlich. Auffallend war die gesteigerte elektrophoretische Mobilität der Komplexe aus $F(ab')_2$ und CK-BB oder CK-MB.
Bemerkenswert war außerdem die Diskrepanz im Laufverhalten beider $F(ab')_2$-Präparationen (Pepsinspaltung, Abb. 23 A, Spur 3 und 4). Der Grund könnte, durch einen weiteren Reinigungsschritt bedingt, in einer Reduzierung der Disulfidbrücken zwischen den beiden $F_{ab'}$-Armen liegen. Aus einem $F(ab')_2$-Fragment würden dann zwei $F_{ab'}$-Teile entstehen.

Die durch Papainspaltung von Antikörpern Rud. erhaltenen Peaks F_2 und F_3 bildeten nach Zugabe von CK-BB oder CK-MB ebenfalls, wenn auch schwächere Makro-CK aus.

IV DISKUSSION

1.) Isolierung CK-bindener Immunglobuline

Die Isolierung der IgG-Fraktion aus Makro-CK-Seren über Ausschlußchromatographie ist langwierig und durch die Verdünnung des Ausgangsmaterials mit hohen Verlusten behaftet.
Deshalb bevorzugten wir eine Isolierung über die Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose Cl-4B. Diese Methode bietet neben ihrer einfachen Handhabung (kurze Trennzeit, geringe Verdünnung) vor allem den Vorteil einer spezifischen Adsorption von Immunglobulinen der Klasse G (Subklasse 1,2 und 4; KROVALL et al 1969, 1970) an Protein A, wobei jeweils zwei Immunglobuline (SJÖQUIST et al 1972) spezifisch mit ihrem F_c-Teil an das Staphylococcen-Protein A gekoppelt werden (SJÖQUIST et al 1967). Diese F_c-Protein-A-Bindung beeinträchtigt einen bestehenden Antigen-Antikörper-Komplex nicht; somit können Makro-CK-Komplexe durch Protein A auch quantitativ gefällt, und damit diagnostisch nachgewiesen werden (BAUER et al 1980). Darüber hinaus eignet sich die Affinitätschromatographie vorzüglich zur Separierung von Immunglobulin-Fragmenten nach Pepsin- oder Papain-Spaltung (GODING 1976, 1978).

2.) Eigenschaften der Makro-Kreatinkinase

A) Bindungskapazitäten nativer Makro-CK-Seren

Bei der Makro-Kreatinkinase handelt es sich offenbar um IgG-CK-BB-Komplexe (URDAL et al 1979, BOHNER et al 1979, STEIN et al 1979, JOCKERS-WRETOU et al 1979). In keinem dieser beschriebenen Makro-CK-Seren konnte jedoch "freie CK-BB" nachgewiesen werden. Es interessierte daher,die freie Bindungskapazität nativer Patienten-Seren mit Makro-CK-Ämie zu bestimmen.

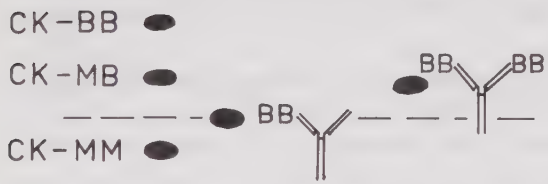
Die Sättigungsversuche zeigen eindeutig, daß die CK-bindenden AK (IgG) im Überschuß vorliegen, denn nach Zugabe von CK-BB bildete sich zusätzlich Makro-CK. Allerdings variierte der Sättigungsgrad von unter 33 % bei Rud. (CK-BB-Aktivität des Serum Rud. 250 U/l) bis zu etwa 50 % bei Nau. (CK-BB-Aktivität des Serum Nau. 170 U/l). Die Sättigung der Seren ist abhängig von der Affinität und dem Serumtiter der Makro-CK-bildenden IgG. Ein weiterer Faktor dürfte das Ausmaß der in den intravasalen Raum übergetretenen CK-BB sein.

B) Rekombination von Makro-CK aus CK-BB und IgG

In Übereinstimmung mit JOCKERS-WRETOU et al 1979 konnten wir CK-BB in vitro mit dem isolierten Immunglobulin (IgG) rekombinieren und somit Makro-CK-BB erzeugen. Die in diesen Bindungsversuchen bisweilen auftretende Fraktion mit MB-Mobilität kann durch zwei unterschiedliche Vorgänge erklärt werden.
Einmal beschrieb CHO et al (1979) eine zeit- und temperaturabhängige Mobilitätsänderung von CK-BB in der Elektrophorese. So war diese "MB-Fraktion" bereits nach drei Stunden bei 37 ^{o}C nachweisbar.

Der Grund dürfte in der durch die Teildenaturierung bedingten sterischen Konfigurationsänderung liegen. Als weitere Möglichkeit könnte sich hinter der "CK-MB" auch ein Makro-Komplex anderer Stöchiometrie verbergen, der in Abhängigkeit von der Antikörper-Konzentration auftritt.

Für Komplex A spräche das Auftreten bei erhöhtem CK-BB-Gehalt und eine größere elektrophoretische Mobilität dieser "CK-MB"-Fraktion.
Die bei niedrigem CK-BB-Gehalt gebildete Form B sollte aufgrund der kleineren Nettoladung eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweisen.



C) Bindungsverhalten isolierter IgG mit homologen CK-Isoenzymen.

In einem weiteren Schritt wurde die Beladung isolierter Patienten-IgG durch homologe CK-Isoenzyme untersucht. Erwartungsgemäß wurde CK-BB von allen drei Patienten-AK mit hoher Affinität gebunden. Zusätzlich hierzu konnte bei Rud. und schwächer bei Nau.I und Doe erstmals eine Komplexierung mit CK-MB nachgewiesen werden. Eine Makro-CK-MM wie von FIEHN et al (1981) und YUU et al (1980)

beschrieben, wurde nicht beobachtet.
Dies legt die Existenz einer für den Patienten-AK antigenen Determinante der B-Kette nahe.
Im Gegensatz hierzu beschrieb PRABHAKARAN et al 1979 eine Aggregation von IgG und CK-BB, die auch mit normalen IgG zu einem hochmolekularen Komplex von 820 000 D führte und daher als physiologischer Abbauweg der CK-BB postuliert wurde. Dies widerspricht unseren Beobachtungen, in denen mit Serum oder IgG von Normalpersonen keine Komplexierung erreicht werden konnte.

Dieser Hypothese steht entgegen, daß Makro-CK im Vergleich zu normaler CK-BB eine außerordentlich hohe Stabilität besitzt, die sich, auch durch den geringen Abbau bedingt, in einer langen intravasalen Persistenz äußert (URDAL et al 1979, JOCKERS-WRETOU et al 1979).
Bei den von uns gefundenen Komplexen zwischen IgG und CK-BB/CK-MB handelt es sich um eine spezifische, im Normalserum nicht nachweisbare Bindung, die mit einer atypischen Elektrophorese und einem erhöhten Molekulargewicht einhergeht (STEIN et al 1980, BOHNER et al 1979 a + b).

D) Kompetitive Bindung zwischen IgG und CK-Isoenzymen

Nachdem wir eine AK-Bindung von CK-BB und CK-MB nachweisen konnten, interessierte in diesem Zusammenhang, Aufschluß über einen der CK-BB und CK-MB gemeinsamen Antikörperbindungsort an der B-Kette und Hinweise über die Bindungsaffinität zu gewinnen.
In unseren Kompetitionsversuchen konnten wir CK-MB, durch steigende Zugabe an CK-BB, quantitativ aus ihrem Makrokomplex drängen; aus Makro-CK-MB wurde somit Makro-CK-BB. Dies bedeutet, daß beide Isoenzyme um eine identische Bindungsstelle des Antikörpers

konkurrieren, der offensichtlich für CK-BB eine wesentlich höhere Affinität besitzt, denn bei einem äquimolaren Verhältnis von CK-BB/CK-MB ist CK-MB nicht mehr an einer Komplexbildung beteiligt. Da bei beiden Isoenzymen die gleichen B-Ketten Determinanten, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität zur Bindung führen, muß die M-Kette von CK-MB die Anlagerung des Antikörpers entweder direkt sterisch oder indirekt, also allosterisch, behindern.

Im umgekehrten Versuchsansatz konnte die CK-BB durch CK-MB-Aktivitäten bis zu 2000 U/l nicht aus dem Komplex gedrängt werden. Dies weist auf eine erheblich höhere Bindungskonstante der CK-BB gegenüber dem Immunglobulin hin. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß sich in vivo CK-MB-Komplexe nur in Spuren ausbilden können und sich deshalb bislang der Entdeckung entzogen haben.

3.) Spezifität der CK-Bindung an IgG

A) Bindungsverhalten pepsingespaltener IgG Rud.

Durch die Kombination von Elektrophoresen und Immungpräzipitationsversuchen konnten wir die spezifische Bindung zwischen $F(ab')_2$-Fragmenten und CK-BB oder CK-MB zeigen. Allgemein erfolgt der Nachweis CK-bindender Immunglobuline über die CK-Aktivität in den Doppeldiffusionsbanden nach Ouchterlony unter folgenden Voraussetzungen:

- der IgG-Anteil des Komplexes bzw. die $F(ab')_2$-Komplexe müssen sterisch für die spezifischen Anti-Seren zugänglich sein.

- der IgG-CK-Komplex muß bei der Präzipitation stabil bleiben. Dies bedeutet, es müssen Doppel-AK-Komplexe ausgebildet werden, die die CK beinhalten und andererseits darf die katalytische Aktivität der CK nicht wesentlich beeinflußt werden.

- CK-Isoenzyme, die in den Immunpräzipitaten nicht komplexgebunden als Makroform vorliegen, werden im Rahmen der Methode ausgewaschen; folglich muß CK-Aktivität, die sich in Präzipitationssicheln anfärben läßt, in komplexierter Form vorliegen.

Interessant war, daß vor allem $F(ab')_2$-CK-BB-Komplexe im Vergleich zur nativen Makro-CK eine veränderte Wanderungstendenz aufwiesen, erklärbar durch die Verminderung des Molekulargewichtes (100 000 statt 160 000 D für das Immunglobulin).

Weiterhin fiel die differente elektrophoretische Mobilität der CK-BB im Ansatz $F(ab')_2$ Peak A und $F(ab')_2$ (Fraktion 2, Abb. 23) auf. Beide Fraktionen waren durch Pepsin-Verdauung gewonnen und repräsen-

tierten lediglich unterschiedliche Reinigungsstufen.
Möglicherweise ist es in der $F(ab')_2$-Fraktion (Fraktion 2) durch zusätzliche Reinigungsschritte zu einer Reduktion der Disulfidbrücken (Nac, Mercapto-Äthanol) und damit zur Bildung von F(ab') (MG 50 000) gekommen. Die Halbierung des Molekulargewichtes könnte die raschere Migration des F(ab')-CK-BB-Komplexes erklären.
Da in keinem Fall eine Komplexierung mit CK-MM gelang, muß die antigene Determinante mit dem B-Monomer assoziiert sein.
Weiterhin konnte im untersuchten Fall gezeigt werden, daß die Leichtketten der CK-bindenden IgG-Fraktion ausschließlich vom Kappa-Typ waren. Dies legt die Existenz monoklonaler AK nahe.

B) Bindungsverhalten papaingespaltener IgG Rud.

Um eine Anlagerung eines F_c- Teiles des IgG an CK-Isoenzyme untersuchen zu können, isolierte man F_c-Fragmente aus papaingespaltenem IgG Rud. (Pepsin verdaut den F_c-Teil, NISONOFF et al, 1960). PORTER (1959) erhielt nach Papainspaltung von IgG univalentes F_{ab} (MG 45 000 D) und F_c (MG 50 000 D). In der von GODING (1978) modifizierten Aufspaltung mit nachfolgender Anreicherung der F_c-Anteile (Protein-A-Säule), konnten diese nicht vollständig von ungespaltenen IgG getrennt werden. Dies zeigte sich deutlich in der immunologischen Kontrolle von Fraktion 1 der Papainspaltung (Abb. 22). In Fraktion 2 und 3 waren keine intakten IgG mehr nachzuweisen, sondern lediglich F_{ab}- und F_c-Anteile. Wahrscheinlich fand eine Nachverdauung der F_c-haltigen Fraktionen durch "mitgeschlepptes" Papain statt.
Interessant erschien das elektrophoretische Verhalten der aus F_{ab} (Papainspaltung) und CK-Isoenzymen

gebildeten Komplexe (Abb. 23, Fraktion F_2 und F_3). Ihre "CK-MB-"Position entsprach den mit ebenfalls univalenten F(ab') (Abb. 23, Fraktion 2, Pepsinspaltung) erzeugten CK-Komplexen.
Mit den obigen Annahmen konnte man auch mit Papain erzeugten univalenten F_{ab}-Fragmenten eine CK-BB- und schwächer eine CK-MB-Komplexierung nachweisen. Übereinstimmend mit der Pepsinspaltung gehörten die AK der Kappa-Reihe an.

Durch diese Untersuchungen konnte in einem Fall von Makro-CK-Ämie (Rud.) die spezifische Bindung einer IgG-Kappa-Fraktion und der B-Kette der Kreatinkinase (CK-BB und CK-MB) nachgewiesen werden. Die antigene Determinante des Enzymes muß folglich der B-Kette zuzuordnen sein. Ein weiterer Hinweis hierfür ist auch die Bindung der Makro-CK an Staphylococcen-Protein A (BAUER et al, 1980, vgl. III 8A). Je nach Makro-CK-Gehalt des Serums werden bis zu 83% der Aktivität durch die Affinitätschromatographie zurückgehalten. Hochmolekulare Kreatinkinase (MG etwa 250 000 D) ist dann nicht mehr nachweisbar.
Da Protein A nach Untersuchungen von KRONVALL et al (1970) IgG an dessen F_c-Stück bindet, muß dieses im Makro-CK-Komplex frei sein und die Interaktion zwischen dem F_{ab}-Teil des IgG und der antigenen Determinante am Enzym darf nicht beeinträchtigt werden. Bei dem untersuchten Patientenserum (Rud.) banden ausschließlich IgG vom Kappa-Leichtketten-Typ, in einem anderen Fall waren nur Antikörper der Lambda-Reihe zu finden.
JOCKERS-WRETOU et al (1979) fanden ebenfalls nur AK mit einer Leichtketten-Spezies. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die CK-bindenden IgG monoklonaler Natur sind.
Interessant war, daß bei Makro-CK-Komplexen aus ungespaltenen IgG eine Einordnung der Makro-CK-

bildenden Immunglobuline in eine der Leichtketten-Spezies nicht möglich war. Der Grund liegt wahrscheinlich in einer sterischen Behinderung des präzipitierenden Antikörpers durch den F_c-Anteil des CK-gebundenen IgG. Durch die Abspaltung des F_c-Teiles Makro-CK-bindender IgG verbessert sich folglich die Zugänglichkeit ihrer Leichtketten. Nach STEIN et al (1981) beträgt das Molekulargewicht von Makro-CK chromatographisch 250 000, das der $F(ab')_2$-CK-Komplexe 160 000. Die F_{ab}-CK-BB lag erwartungsgemäß bei 130 000. Legt man für die CK-Isoenzyme ein Molekulargewicht von 80 000 zugrunde, so würde damit die von JOCKERS-WRETOU et al (1979) vermutete 1 : 1-Bindung zwischen Immunglobulin und Enzym bestätigt werden.

Diese Ergebnisse widersprechen den von PRABHAKARAN et al (1979) beschriebenen unspezifischen Aggregationen aus willkürlich gewählten IgG und CK-BB, in denen er einen physiologischen Abbauweg intravasaler CK-BB vermutete.
Diese Vermutung ist zudem wenig wahrscheinlich, da für IgG-CK-BB-Komplexe, im Vergleich zu ungebundener CK-BB, eine außerordentlich hohe Stabilität (BOHNER et al 1981) in Verbindung mit einer verlängerten intravasalen Präsenz (STEIN et al 1979; YUU et al 1980) angegeben wird.

Im Unterschied zu den hier untersuchten Immunglobulin-CK-Komplexen sind von HOMBURGER et al (1980) und LEROUX et al (1977) abnorme elektrophoretische CK-Banden in Gewebsextrakten aus Herz- und Skelettmuskel sowie im Serum beobachtet worden. Diese "metastabilen" Kreatinkinasen besitzen jedoch ein normales Molekulargewicht und dürften daher teildenaturierten Enzymen entsprechen. In diesen Zusammenhang wären auch die Beobachtungen von LIM (1975) und SAX et al (1979) einzuordnen.

V ZUSAMMENFASSUNG

1.) Die Isoenzyme der Kreatinkinase wurden durch säulenchromatographische Trennungen aus humanem Gewebe (CK-BB aus Uterus, CK-MB aus Myokard und CK-MM aus Skelettmuskel) isoliert.

2.) Der zweite Komplexpartner, CK-BB-bindende IgG-wurden nach acidolytischer Spaltung des Komplexes aus Makro-CK-Ämie-Seren dargestellt. Hierzu kamen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung: Eine ausschlußchromatographische Trennung der Serumbestandteile sowie eine hochspezifische Affinitätschromatographie an Staphylokokken-Protein A.

3.) Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Bindung zwischen CK-BB und IgG reversibel ist. Aus Makro-CK-Ämie-Seren isoliertes Immunglobulin G und homologe CK-BB bilden in vitro ebenfalls Makro-CK-Komplexe, die identisch sind mit den in vivo existenten Formen.

4.) Weiterhin konnte erstmals eine Bindung von CK-MB durch CK-bindende IgG nachgewiesen werden. Dieser Komplex zeigte ebenfalls typische Makro-CK-Eigenschaften, allerdings bei einer wesentlich geringeren Bindungsaffinität der IgG-Moleküle für CK-MB. Die M-Untereinheit der CK-MB hat folglich einen protektiven Einfluß.

5.) Die Bindung zwischen CK-BB und IgG ist spezifisch: Beide Isoenzyme (CK-BB und CK-MB) zeigen eine typische Kompetition um die Bindungsstelle des Immunglobulin G. CK-MB kann durch steigende Aktivitäten an CK-BB aus dem Makro-Komplex verdrängt werden. Dieser Kompetition muß folglich eine für das IgG-Molekül antigene Determinante der B-Untereinheit zugrunde liegen.

6.) Diese Befunde wurden durch eine Pepsin- und Papainverdauung Makro-CK-bildender IgG erhärtet. In immunologischen und elektrophoretischen Versuchen gelang der Nachweis einer Bindung von $F(ab')_2$-Fragmenten aus Pepsinspaltung und F_{ab}-Teilen aus Papainverdauung, während eine Interaktion der Kreatinkinase mit dem F_c-Teil des IgG nicht beobachtet wurde.
Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß die Makro-CK-Aktivität im Serum quantitativ durch Protein A gefällt werden kann.
Das F_c-Teil des IgG ist daher im Makro-CK-Komplex frei.

7.) Weiterhin wurde die Leichtketten-Zugehörigkeit der IgG identifiziert. Im Serum Rud. gehörten die Makro-CK-bildenden IgG ausschließlich der Kappa-Leichtketten-Reihe an. In einem weiteren Fall waren nur IgG der Lambda-Leichtketten-Reihe an der Komplexbildung beteiligt (STEIN et al 1981). Dies deutet mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen eines jeweils monoklonalen IgG hin, das etwa im Rahmen einer benignen Gammapathie gedeutet werden kann.

VI LITERATUR

BAUER, K., P.M. BAYER, E. DEUTSCH and F. GABL:
Binding of enzyme-IgG-complexes in human serum to protein A sepharose CL-4B.
Clin. Chem. 26/2, 297 - 300, (1980)

BAYER, P.M.; GERGELY, T.; GABL, F. and DEUTSCH, E.:
Serum-induced changes in elektrophoretic mobility of creatine phosphokinase isoenzymes?
Clin. Chim. Acta, 79, 261 - 263, (1977)

BIEWENGA, J.:
Heterogeneity in electrophoretic mobility and in molekular size of Lactate Dehydrogenase-Immunglobulin G complexes.
Clin. Chim. Acta, 76, 149 - 153, (1977).

BLUM, H., WEBER, B., DEUS, B., UEBERGERG, H. und GEROK, W.:
Nachweis eines mitochondrialen Isoenzymes der Kreatinkinase im menschlichen Herzmuskel.
Gesellschaft für Biologische Chemie, 359, 254 - 255, (1978)

BLUM, H., WEBER, B., DEUS, B. an GEROK, B.
Purification and properties of mitochondrial Creatine Kinase from human heart.
Biochemical Society and Gesellschaft für Biologische

Chemie 359, 1058, (1978)

BOHNER, J., W. STEIN, E. KUHLMANN and M. EGGSTEIN: Serum-creatine-kinase BB linked to immunglobulin G Clin. Chim. Acta 97, 83 - 88, (1979)

BOHNER, J., STEIN, W., RENN, W., STEINHART, R. and EGGSTEIN, W.: Stability of macro creatine kinases and creatine kinase isoenzymes compared: heat inactivation test for determination of thermostable creatine kinases. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 19, in press, (1981).

CHEMNITZ, G., E. JOCKERS-WRETOU, E. SCHMIDT, F.W.SCHMIDT and J. LOBERS: Macro-creatine-kinase-BB: observations on six patients. J. Clin. Chem. and Clin. Biochem. 17, 725 - 729, (1979).

CHO, H.W., MELTZER, H. and JOUNG, J.: Effect of incubation in human plasma on electrophoretic mobility of brain-type Creatine Phosphokinase. Clin. Chim. Acta, 73, 257 - 265, (1976).

CHO, H.W. and MELTZER, H.: Factors affecting stability of isoenzymes of Creatine Phosphokinase. Am. J. Clin. Pathol., 71, 75 - 82, (1979).

DAWSON, D., H. EPPENBERGER, and N.KAPLAN: The comparative enzymology of creatine-kinases. J. Biol. Chem. 242/2, 210 - 217,

(1967).

Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie.
Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der Creatin-Kinase.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 249 - 254, (1977).

FIEHN, W. and SEILER, D.: Macrocreatine Kinase in plasma: A cause for a false positive CK-MB Immunoinhibition Test. Klin. Wochenschr. 59, 141 - 144, 1981.

GERHARDT, W., LJUNGDAHL, L., BÖRJESSON, J., HOFENDAHL, S. and HEDENÄS, B.: Creatine Kinase B subunit Activity in Human Serum I. Development of an Immunoinhibition Method for Routine Determination of S-Creatine, Kinase B-subunit Activity. Clin. Chim. Acta 78, 29 - 41, 1977

GODING, J.W.: Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modification to the standard methods. J. of Immunolog. Methods 13, 215 - 226, 1976.

HAUX, P., F. SCHEIDT, D. SOBE und R. KATTERMANN: Diagnostische Aussagekraft der Kreatin-Kinase-MB: Verlaufsuntersuchungen bei kardialen und zerebralen Erkrankungen. J. Clin. Chem. and Clin. Biochem. 17, 747 - 755, 1979

HOMBURGER, H.A., L. WOLD, G.L. JACOB and J.O'BRIEN: Metastable creatine-kinase-BB and complexes of creatine-kinase BB and immunglobuline G, atypical isoenzymes with similar electrophoretic mobility.
Clin. Chem. 26/1, 78 - 83, 1980.

JAMES, G. and HARRISCH, R.: Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum.
Clin. Chem. 25/6, 943 - 947, 1979.

JOCKERS-WRETOU, E. and G. PFLEIDERER: Quantitation of creatine-kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method.
Clin. Chem. Acta 58, 223 - 232, 1975.

JOCKERS-WRETOU, E. and E. PLESSING: Atypical serum-creatine-kinase isoenzyme pattern caused by complexing of creatine-kinase BB with immunglobulins G and A.
J. Clin. Chem. and Clin. Biochem. 17, 731 - 737, 1979

JUNG, K., R. NEUMANN, G. COBET, E.NUGEL and E. EGGER: Creatine-kinase isoenzyme BB in serum of healthy adults and children.
Clin. Chim. Acta 91, 165 - 168, 1979.

KAJITA, Y., MAJIMA, T., YOSHIMURA, M., HACHIYA, T., MIYAZAKI, T., IJICHI, H. and OCHI, Y.: Demonstration of

antibody for Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT) in chronic hepatic disorders. Clin. Chim. Acta 89, 485 - 492, (1978).

KANNO, T. and SUDO, K.: Properties of Amylase-linked immunglobulins. Clin. Chim. Acta, 76, 67 - 77, (1977).

KOBAYASHI, T. NAKAYAMA, T. and KITAMURA, M.: Elektrophoretic identification of serum immunglobulins linked to Amylase: Makroamylase. Clin. Chim. Acta, 86, 261- 265, (1978).

KONTTINEN, A., MURROS, J., OJALA, K., SALASPURO, M., SOMER, H. and RÄSÄNEN, J.: A new cause of increased serum Aspertat-Aminotransferase activity. Clin. Chim. Acta, 84, 145 - 147, (1978).

KROVALL, G. and WILLIAMS, R.C.: Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. J. Immulog. 103, 828 - 833, 1969.

KROVALL, G. and FROMMEL, D.: Definition of staphylococcal protein A reaktivity for human immunoglobulin G fragments. Immunochemistry 7, 124 - 127, 1970.

LANG, J., U. WÜRZBURG, D. NEUMEIER, M. KNEDEL, W. PRELL-WITZ, R. KATTERMANN, H. SCHLEBUSCH und J. SCHÜRMANN: Creatin-Kinase-Isoenzyme: idiopathisches Auftreten von Creatin-Kinase-BB-Aktivitäten im Serum von Patieten. Klin. Wochenschr. 56, 641 - 646, 1978.

LEHNINGER, A.L.: Biochemistry. The energy-charge of the ATP-system. second edn. Worth Publishers Inc., pp 538 - 539, 1975.

LEROUX, M., JACOBS, H.K., RABKIN, S.W. and DESJARDINS, P.R.: Measurement of creatine kinase Z in human sera using a DEAE-Cellulose mini-column method. Clin. Chim. Acta 80, 253 - 264, 1977.

LIM, F.: Significance and applications of CPK-isoenzyme subbands in clinical laboratory. Clin. Chem. 21/7, 975, 1975.

LJUNGDAHL, L. and W. GERHARDT: Creatine-kinase isoenzyme variants in human serum. Clin. Chem. 24/5, 832 - 834, 1978.

MORIN, L.G.: Improved separation of creatine-kinase cardiac-isoenzyme in serum by Batch-fractionation. Clin. Chem. 22/1, 92 - 97, 1976.

NAGAMINE, M and OHKUMA, S.: Serum Alkaline Phosphatase isoenzymes linked to Immunglobulin G.
Clin. Chim. Acta, 65, 39 - 46, (1975).

NISONOFF, A., WISSLER, F., LIPMAN, L. and WOERNLEY, D.L.: Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds.
Arch. Biochem. Biophys. 89, 230 - 244, 1960.

PORTER, R.R.: The hydrolysis of rabbit y-globulin and antibodies with crystalline Papain.
Biochem. J. 73, 119 - 126, 1959.

PRABHAKARAN, V., D.A. NEALON and A.R. HENDERSON: Interaction between human IgG and human creatine-kinase isoenzyme 1 in serum: a route for the intravascular catabolism of creatine-kinase 1.
Clin. Chem. 25/1, 112 - 166, 1979.

PRELLWITZ, W., KAPP, S., NEUMEIER, D., KNEDEL, M., LANG, H. und HEUWINKEL, D.: Isoenzyme der Kreatin-Kinase: Verteilungsmuster in der Skelettmuskulatur und im Serum bei Erkrankungen sowie Schädigungen der Muskulatur.
Kli. Wo., 56, 559 - 565, (1978).

SAX, S.M., J.J. MOORE, J.L. GIEGEL and M. WELSH: Atypical increase in serum

creatine-kinase activity in hospital patients.
Clin. Chem. 22/1, 87 - 91, 1976.

SAX, S.M., J.J. MOORE, J.L. GIEGEL and M. WELSH: Further observations on the incidence and nature of atypical creatine-kinase activity.
Clin. Chem. 25/4, 535 - 541, 1979.

SJÖQUIST, J., FORSGREN, A., GUSTAFSON, G.T. et al: Interaction between gamma globulins and protein A from Staphylococcus aureus.
Nobel Symposium 3, 341 - 348, 1967.

SJÖQUIST, J., MELOUN, B. and HJELM, H.: Protein A isolated from Staphylococcus aureus after disgestion with lysostaphin.
Eur. J. Biochem. 29, 572 - 578, 1972.

STEIN, W. and J. BOHNER: Immunglobulin-band creatine-kinase BB ("Makro-CK") in three patients with different disease.
Clin. Chem. 25/8, 1513 - 1514, 1979.

STEIN, W. und BOHNER, J.: Makro-Kreatinkinase.
Klin. Wochenschr. 57, 1117 - 1121, 1979.

STEIN, W., BOHNER, J. und EGGSTEIN, M.: Eigenschaften und Bedeutung von Makro-Kreatinkinasen.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 17, 739 - 745, 1979.

STEIN, W., BOHNER, J., KRAIS, J., MÜLLER, M., STEINHART, R. und EGGSTEIN, M.: Makro creatine kinase BB: Evidence for spezific binding between creatine kinase BB and immunglobulin G.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 925 - 930, 1981

URDAL, P. and S. LANDAAS: Macro-creatine-kinase BB in serum, and some data on it's prevalence.
Clin. Chem. 25/3, 461 - 465, 1979.

YUU, H., Y. TAKAGI, O. SENJU, J.-I. HOSOYA, K. GOMI and T ISHII: Creatine-kinase isoenzyme of high molecular mass in serum of a cancer patient.
Clin. Chem. 24/11, 2054 - 2057, 1978.

YUU, H.; ISHIZAWA, S.; TAKAGI, Y.; GOMI, K.; SENJU, O. and ISHII, T.: Macro-Creatin Kinase: A study of an CK-linked Immunglobulin.
Clin. Chem. 26/13, 1816 - 1820, (1980).

LEBENSLAUF

Name:	Müller, Michael Matthias
Geb.:	24.02.1954 in Karlsruhe; evangelische Konfession.
Eltern:	Dr. Bernhard Müller, Oberstudiendirektor Gertrud Müller, Oberlehrerin
Geschwister:	Thomas Bernhard Müller (geb. 1962)
Wohnort:	7750 Konstanz 16, Am See 26
Schulbildung:	4 Jahre Grundschule in Karlsruhe 9 Jahre Gymnasium, davon in Karlsruhe 1965 - 1969 in Konstanz 1969 - 1973 Abitur Juni 1973
Bundeswehr:	Vom 2. Juni 1973 bis 30. September 1974, in Roth b. Nürnberg u. Lenggries
Studium:	Vom WS 1974 - SS 1977 Biologie Diplom, Fachrichtung Biochemie, Universität Konstanz, Vordiplom Biologie, Diplom SS 1976. Seit WS 1976 Studiengangwechsel. Fach: Humanmedizin an der GHS Essen Physikum in Mühlheim/Ruhr, August 1978. Klinischer Abschnitt: Seit WS 1978 an der Universität Tübingen Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Reutlingen, August 1979. Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen, August 1981. Praktisches Jahr: Seit Oktober 1981 am Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen. Ärztliche Prüfung in Friedrichshafen am 12.10.82.